



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS DE UM MODELO
EXPERIMENTAL DE ATAQUE DE PÂNICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

RUBIA DE SOUZA ARMINI

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

VITÓRIA, ES

2012

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Fisiológicas do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências Fisiológicas.**

**Vitória, ES
2012**

Armini, Rubia de Souza

Respostas Neuroendócrinas num Modelo
Experimental de Ataque de Pânico

Armini, R.S – Vitória, 2012.

**Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de
Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Espírito Santo.**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Pânico, Corticosterona, Matéria Cinzenta
Periaquedutal, Estresse, Estimulação Elétrica
Intracraniana.

RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ATAQUE DE PÂNICO

RUBIA DE SOUZA ARMINI

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. LUIZ CARLOS SCHENBERG – ORIENTADOR
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

Prof^a. Dr^a. DEBORAH SUCHECKI
Departamento de Psicobiologia – UNIFESP

Prof^a. Dr^a. KARLA NIVEA SAMPAIO
Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFES

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro de Ciências da Saúde – UFES

Vitória, 5 de outubro de 2012

Ao meu pai (in memorian) e minha mãe por sempre me apoiar nesta encantadora jornada que escolhi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof Schenberg por me aceitar no mestrado. Obrigada por todo ensinamento e pelo apoio fundamental em todas às vezes em que tudo deu errado. Suas palavras certas nestes meus momentos de decepção foram muito importantes. Agradeço também pelo desafiante projeto que adorei realizar. Obrigada não apenas pela excelente orientação, mas também pelo exemplo de um grande Mestre.

Ao Dr. Sergio Tuffic e Magda Bignotto do Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP e da Associação de Fundo de Incentivo a Pesquisa (AFIP), obrigada pela realização de todas as dosagens plasmáticas. Serei sempre grata pelo grande apoio.

À Prof^a. Dr^a. Deborah Suchecki e Prof^a e Dr^a. Karla Nívea Sampaio por aceitarem o convite de participar desta defesa de mestrado.

Agradeço a prof^a Ana Paula por esclarecer minhas dúvidas. Pelas ótimas conversas dentro do laboratório sempre enriquecedora. Poder contar com sua ajuda foi fundamental.

Aos colegas de trabalho, mestre e futuro mestre Caroline Azevedo Rosa e Cristie S. Bernabé, obrigada pela amizade e por todos os dias de trabalho juntos. Além de colega de trabalho, também são grandes amigos. A contribuição de vocês foi fundamental para a conclusão desse trabalho. Aprendemos juntos que ciência se faz em Equipe. Que nossa parceria científica dure por muitos anos.

Ao aluno de iniciação científica, Carlos Siller, obrigada por ter chegado no momento certo, por toda sua ajuda, bom humor, prestatividade. Sua participação foi fundamental.

À todos os outros colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, muito obrigada.

À todos meus familiares, obrigada tantos momentos felizes.

Aos amigos, presente e ausentes, obrigada pela força e por estarem sempre torcendo por mim.

À CAPES, agradeço pelo apoio financeiro durante esse 2 anos.

ABREVIATURAS

28D-GR – Ratos com 28 dias de pós cirurgico e mantidos em grupo (4/caixa)

28D-GRc – Ratos com 28 dias de pós cirurgico, mantidos em grupo (4/caixa) e conectados ao cabo de estimulação elétrica

28D-IS – Ratos com 28 dias de pós cirurgico e mantidos isolamento

5D-GR – Ratos com 5 dias de pós cirurgico e mantidos em grupo (4/caixa)

5-HIAA – Ácido 5-hidroxi-indolacético

5-HT - Serotonina

5HT-3 – Receptor 3 de Serotonina

ACTH – Corticotrofina

AGd – Arena Grande

AMB – Núcleo Ambíguo

AP – Ataque de Pânico

APq – Arena Pequena

AVP – Vasopressina

BLA – Amígdala Basolateral

C.V. – Coeficiente de Variação

CAN-1D – Ratos implantados com cânulas intra-atriais e recuperação cirúrgica de 1 dia

CAN-3D – Ratos implantados com cânulas intra-atriais e recuperação cirúrgica de 3 dias

CCK – Colecistocinina

CCK-A – Receptor A de Colecistocinina

CE – Choques Escapáveis

CHQ – Choque

CI – Choques Inescapáveis

CO₂ – Dióxido de Carbono

CORT – Corticosterona

Cov – Covariância

CPF – Córtex Pré-frontal

CPFm – Córtex Pré-frontal Medial

CRF – Fator Liberador de Corticotropina

CRH – Hormônio Liberador de Corticotropina

CTR – Controle

CTR-CHQ – Controle de Choque

CTRL-AGd – Controle de Arena Grande

CTRL-APq – Controle de Arena Pequena

CTRL-BIO – Controle de Biotério

CTRL-CHQ – Controle de Choque

CTRL-CIR – Controle de Cirurgia

CV – Coeficiente de Variação

DA – Desamparo Aprendido

DA – Dopamina

DEF – Defecação

DMH – Hipotálamo Dorso Medial

DMV – Núcleo Motor Dorsal do Vago

DPAG – Dorsal Periaqueductal Gray

EIC – Estimulação Intra-Craniana

EIC-APq – Estimulação Intra-Craniana em Arena Pequena

EIC-APq30 – Estimulação Intra-Craniana em Arena Pequena e mantidos na APq por 30 minutos

EPI – Epinefrina

EPM – Erro Padrão da Média

EXO - Exoftalmia

FNA – Fator Natriurético Atrial

GABA – Ácido Gamaamino-Butírico

GABA-A – Receptor Tipo A de Ácido Gamaamino-Butírico

GAL-AGd – Galope em Arena Grande

GLI – Glicose

GLP – Galope

GLP/ROT – Comportamento de Rotação na AP

GR – receptor tipo-II ou de glicocorticoide

HAB – Habituação

HDM – Hipotálamo Dorsomedial

HDMc – Porção Compacta do Hipotálamo Dorsomedial

HDMd – Porção Difusa do Hipotálamo Dorsomedial

HHA – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HVM – Hipotálamo Ventromedial

IC – Intervalo de Confiança

IMO – Imobilidade

IMO-AGd – Imobilidade em Arena Grande

IS – Interação Social

ISN – Isolamento Social Neonatal

ISO-3D – Isolamento Social de 3 Dias

ISO-6D – Isolamento Social de 6 Dias

ISRS – Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

KCN – Cianeto de Potássio

LAC – Lactato

LCE – Labirito em Cruz Elevado

MCPA – Matéria Cinzenta Periaquedutal

MCPD – Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal

MCPDL – Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsolateral

MCPL – Matéria Cinzenta Periaquedutal Lateral

MCPV – Matéria Cinzenta Periaquedutal Ventral

MDD – Núcleo Medular Dorsal

MIC – Micção

MR – (receptor tipo-I ou de mineralocorticóide

MTZ – Metimazol

NDR – Núcleo Dorsal da Rafe

NE – Noradrenalina

NMnR – Núcleo Mediano da Rafe

NSI – Isolamento Social Neonatal

OVLT – Órgão Vascular da Lamina Terminal

PA – Panic Attack

PRL – Prolactina

PrRP – Peptídeo Liberador de Prolactina

PVN – Núcleo Paraventricular

RPC – Núcleo Reticular Parvocelular

ROT – Rotação

SHRP – Período Hiporresponsivo ao Estresse

SLT – Salto

TAG – Transtorno de Ansiedade Generalizada

TDFL – Transtorno Disfórico da Fase Lútea

TP – Transtorno do Pânico

TRH – Hormônio Liberador de Tireotrofina

TRI – Triglicérides

TRT–Trote

TSFP – Teste Simulado de Falar em Público

VBM – Morfometria Baseada em Voxel

ÍNDICE

Resumo.....	1
Abstract.....	4
Revisão: Transtorno do pânico e função hipotálamo-hipófise-adrenal.....	7
Transtorno do pânico.....	8
Bases neurais dos ataques de pânico.....	14
Comorbidade do transtorno de pânico.....	28
Transtorno do estresse.....	33
Transtorno do pânico e estresse	42
Objetivos.....	48
1-objetivo geral.....	48
2-objetivos específicos.....	48
Estudo I: Efeitos estressantes do manuseio diário e exposição repetida ao ambiente: fim de um mito?	49
Resumo.....	50
Introdução.....	51
Materiais e métodos.....	55
Animais.....	56
Coleta de sangue	56
Implantação de eletrodos	57
Implantação de cânulas intra-atriais	58
Ensaio bioquímico	59
Protocolos Experimentais.....	60
1 – Controles intactos (CTRL-BIOT).....	60
2 – Ratos submetidos ao procedimento de habituação (HAB).....	60
3 – Ratos submetidos ao isolamento social durante 3 dias (iso-3d) e 6 dias (ISO-6D).....	60
4 – Ratos implantados com cânulas intra-atriais e recuperação cirúrgica de 1 dia (CAN-1D) ou 3 dias (CAN-3D).....	60
5 – Ratos implantados com eletrodos intracranianos com recuperações cirúrgicas de 5 e 28 dias em grupos de 4 animais (5D-GR e 28D-GR) ou de 28 dias em isolamento (28D-IS).....	61
Análise estatística.....	61

Resultados.....	62
1 – Efeitos da habituação e do isolamento social por 3 e 6 dias nos níveis plasmáticos matinais de ACTH, CORT, GLI, TRI e LAC.....	62
2 – Efeitos da implantação de cânulas intra-atriais com períodos de recuperação cirúrgica de 1 e 3 dias nos níveis plasmáticos matinais de ACTH, CORT, GLI, TRI e LAC.....	64
3 – Efeitos da implantação de eletrodos intracranianos nos níveis plasmáticos de acth, cort, gli, lac e tri de ratos com recuperação cirúrgica em grupo, numa caixa de polipropileno, por períodos de 5 (5D-GR) e 28 dias (28D-GR), ou em isolamento, numa caixas de vidro, por 28 dias (28D-IS).....	67
Discussão.....	71
Estudo II: Ausência de respostas neuroendócrinas após a estimulação elétrica aversiva da matéria cinzenta periaquedutal dorsal do rato.....	78
Resumo.....	79
Introdução.....	80
Materiais e métodos.....	85
Animais.....	86
Implantação de Eletrodos.....	86
Estimulação intracraniana.....	87
Registro comportamental.....	89
Determinação da latência da resposta de ACTH.....	89
Coleta de Sangue.....	89
Histologia.....	90
Ensaio Bioquímicos.....	90
Protocolos experimentais.....	91
1 –Determinação da latência de resposta do ACTHExperimento.	91
2 – Efeitos hormonais e metabólicos da estimulação elétrica da MCPD com as intensidades limiares das respostas de imobilidade (IMO-AGd) ou galope (GAL-AGd) numa arena grande.....	91

3 – Efeitos hormonais e metabólicos da estimulação elétrica da MCPD com a intensidade limiar de galope da arena grande aplicada em ratos colocados numa arena pequena (EIC-APq). Experimento	92
4 –Efeitos hormonais e metabólicos 30 minutos após a estimulação elétrica da MCPD com a intensidade limiar de galope da arena grande em ratos colocados numa arena pequena (EIC-APq30)	92
Estatística.....	93
Análise das variáveis binárias.....	93
Análise das variáveis contínuas	94
Resultados.....	96
1 – Determinação da latência de resposta do ACTH.....	97
Sítios estimulados.....	101
2 – Efeitos hormonais e metabólicos da estimulação elétrica da MCPD na arena grande nas intensidades limiares das respostas de imobilidade (IMO-AGd) ou galope (GAL-AGd).....	103
3 – Efeitos hormonais e metabólicos da estimulação elétrica da MCPD com a intensidade limiar de galope da arena grande aplicada em ratos colocados numa arena pequena (EIC-APq).....	108
4 – Efeitos hormonais e metabólicos 30 minutos após a estimulação elétrica da MCPD de ratos confinados numa arena pequena com a intensidade limiar de galope registrada na arena grande.....	112
Discussão.....	116
Conclusões.....	122

RESUMO

RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE ATAQUE DE PÂNICO. Armini, R.S., Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Es, Brasil, 2012. Os ataques de pânico (AP) em humanos, tanto espontâneos como induzidos por lactato de sódio, não são acompanhados pelo aumento da secreção dos 'hormônios do estresse' de corticotrofina (ACTH), cortisol (CORT) e prolactina (PRL). Estudos anteriores mostraram que estes hormônios também não são alterados após os comportamentos de defesa produzidos por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) de ratos. Contudo, os níveis matinais de CORT destes experimentos situavam-se em torno de 300 ng/ml, valores muito superiores aos esperados (60-100 ng/ml). Embora os valores basais de CORT não expliquem a ausência de resposta da PRL, eles podem ter inibido a resposta de ACTH. De fato, estudos posteriores de outros autores mostraram que ratos com níveis normais de CORT apresentaram aumentos significantes dos níveis deste hormônio 30 min após o comportamento de fuga induzido por estimulação da MCPD. Contudo, a elevação da CORT pode ter sido devida ao esforço muscular da resposta intensa de fuga. Assim, o presente estudo analisou a influência de rotinas laboratoriais nos níveis basais dos hormônios do estresse (Estudo I) e re-examinou as respostas hormonais à estimulação da MCPD em arenas com diâmetro grande (60 cm) ou pequeno (20 cm), na qual as respostas de trote e galope são suprimidas (Estudo II). Dentre outros resultados, o Estudo I mostrou que o manuseio diário e exposição repetida ao mesmo ambiente potenciam as respostas neuroendócrinas destes procedimentos. Por sua vez, o Estudo II corroborou os resultados anteriores

com estimulação na arena grande e mostrou que ratos com níveis basais reduzidos de CORT não apresentam alteração alguma dos hormônios do estresse 2 ou 30 min após estimulações na arena pequena com a intensidade limiar de fuga da arena grande. Estes resultados são consistentes com a mediação dos AP pela MCPD.

Palavras chave: Ataque de Pânico, Matéria Cinzenta Periaquedutal, Estresse, Adrenocorticotrofina, Corticosterona, Prolactina, Glicose, Lactato, Triglicérides.

ABSTRACT

NEUROENDOCRINE RESPONSES OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF PANIC ATTACKS. Armini, R.S., MSc Thesis, Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil, 2012.

In humans, spontaneous and lactate-induced panic attacks (PA) are not accompanied by the increase in the 'stress hormones' corticotropin (ACTH), corticosterone (CORT) and prolactin (PRL). Previous studies showed in turn that the 'stress hormones' remain unchanged following the defensive behaviors induced by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) of rats. However, the CORT morning basal levels of these rats were about 300 ng/ml, which are much higher than the expected 60-100 ng/ml. Although the CORT baseline level bears no relationship with PRL responses, they could explain the lack of ACTH responses. Indeed, other researchers reported significant increases in CORT plasma levels 30 min after DPAG-evoked escape responses. Yet, it remains unclear whether the latter results were due to the muscle exertion or emotional response. Therefore, the present study both examined the laboratory routines influencing the basal secretion of stress hormones (Study I) and reexamined the stress hormone responses to DPAG stimulations of same intensities in arenas with diameters either large (60 cm) or small (20 cm), in which trotting and galloping are suppressed. Result of Study I showed that daily handling and repeated exposures to the arena sensitize the neuroendocrine responses. In turn, the Study II corroborated the previous studies with stimulation in the large arena and showed that rats with reduced CORT baseline levels failed in presenting any neuroendocrine responses following the DPAG stimulation in the small arena with the flight

threshold intensity recorded in the large arena. These results support the DPAG-evoked responses as a model of PA.

Keywords: Panic Attack, Periaqueductal Gray Matter, Stress, Corticotropin, Corticosterone, Prolactin.

REVISÃO:

**TRANSTORNO DO PÂNICO E FUNÇÃO HIPOTÁLAMO-
HIPÓFISE-ADRENAL**

TRANSTORNO DO PÂNICO

A ansiedade faz parte da vida de todo ser humano, servindo para a preservação do indivíduo e da espécie. Por exemplo, a ansiedade provocada pelo odor de fumaça pode motivar a fuga de um prédio antes que este seja consumido em chamas. As reações de pânico também podem servir à preservação, tal como ocorre nas respostas de fuga desenfreada diante de catástrofes como o atentado ao World Trade Center ou o tsunami da Indonésia. Contudo, a ansiedade sem causa aparente ou desproporcional às ameaças, reais ou imaginadas, é um sintoma de um quadro patológico de ansiedade. Dentre estes, os ataques de pânico (AP) consistem no estado mais intenso de ansiedade (APA, 1980), como podemos observar no relato pessoal de um paciente em sua primeira crise de pânico.

“...entrei em um estado de terror absoluto. Comecei a tremer freneticamente, dos pés aos dentes. O suor escorria pelo rosto e ensopava as mãos. A boca estava insuportavelmente seca. A taquicardia atingia níveis assustadores. Eu não entendia como ainda não desmaiara. Jamais sentira algo semelhante. Nunca imaginei que tal terror fosse possível. Eu só queria fugir. Não queria estar onde estava, e sim num lugar seguro com alguém conhecido e confiável. Não sei dizer do quê, mas eu só queria fugir...então, numa atitude que até hoje não entendo, comecei a correr pelo acostamento...”. (Keller, 1997).

Sigmund Freud (1895) foi o primeiro a descrever os transtornos de ansiedade (*Angstneuroses*). Freud distinguiu estes transtornos da depressão maior (melancolia) e de uma ampla gama de condições psiquiátricas

denominadas à época de “neurastenias”. Dentre os transtornos de ansiedade, Freud distinguiu duas síndromes fundamentais, quais sejam, a “expectativa ansiosa” ou “apreensão” (*Angstliche*), que ele considerava a forma predominante do transtorno de ansiedade, e uma síndrome menos frequente, porém igualmente importante, que ele denominou ataque de angústia (*Angstanfall*). De acordo com suas descrições, a expectativa ansiosa consistia num *“quantum de ansiedade livre e flutuante que controlava a escolha de idéias por antecipação”*. Em contraste, nos ataques de ansiedade a *“ansiedade irrompia repentinamente na consciência sem ter sido eliciada por qualquer idéia”*. Freud ressaltou que estes ataques podiam manifestar-se tanto como *“um sentimento puro de ansiedade”* quanto pela combinação da ansiedade com *“a interpretação mais próxima do término na vida, tal como a idéia de morte súbita ou da perda da razão”* ou combinados à *“alguma parestesia”*[ou ao] *distúrbio de uma ou mais funções somáticas, tais como a respiração, atividade cardíaca, inervação vasomotora e atividade glandular*. Eventualmente, Freud distinguiu os ataques de angústia das fobias, do transtorno obsessivo-compulsivo (neurose obsessiva) e transtorno do estresse pós-traumático (neurose comum), dentre outras condições. Suas descrições clínicas da “expectativa ansiosa” e do “ataque de angústia” são bastante similares aos diagnósticos atuais do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e dos ataques de pânico (AP), respectivamente (APA, 2000).

Contudo, enquanto os transtornos de ansiedade continuaram a ser diagnosticados como neurastenias até meados do século passado, os AP receberam uma variedade estonteante de nomes, incluindo neurose da ansiedade, reação de ansiedade, neurastenia, astenia neurocirculatória,

neurose vasomotora, taquicardia nervosa, síndrome de esforço, síndrome de Da Costa, coração de soldado, coração irritável e síndrome respiratória comportamental, entre outros (Pitts e McClure, 1967).

Este cenário começou a alterar-se após a publicação do estudo influente de Donald Klein (1964) mostrando que o TAG e os AP respondiam a classes diferentes de drogas. Klein mostrou que enquanto a “*expectativa ansiosa*” era tratada por ansiolíticos (barbitúricos, meprobamato, e clordiazepóxido) e doses baixas de sedativos (fenotiazinas), os ataques de pânico eram tratados pela administração crônica do antidepressivo tricíclico imipramina.

Ao redor da mesma época, Pitts e McClure (1967) demonstraram que os AP tinham “marcadores fisiológicos”, uma vez que podiam ser precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio (0,5 M) em pacientes predispostos, mas não em voluntários normais. Por outro lado, Cohen e White (1951) já haviam mostrado que os AP podiam ser precipitados pela inalação de misturas com 5% de dióxido de carbono (CO₂), mas não no exercício ou no ar ambiente (Klein, 1993b). Estudos posteriores forneceram provas numerosas das propriedades panicogênicas do lactato de sódio e CO₂, bem como de outros agentes (Graeff *et al.*, 2005). Contudo, embora a ioimbina (antagonista alfa-2 adrenérgico) produzisse AP em mais de dois terços dos pacientes com transtorno de pânico (TP) (Charney *et al.*, 1984), ela também provocava o aumento da ansiedade em pessoas normais, tal como ocorre com a cafeína, colecistocinina (CCK) e outras drogas com ação panicogênica (Klein, 1993b).

Os marcadores fisiológicos e tratamentos específicos do TP sugeriam a existência de um funcionamento anormal de circuitos específicos

do cérebro. Contudo, o TP somente foi incluído na classificação dos transtornos de ansiedade da Associação Psiquiátrica Norte-Americana quase um século após as observações pioneiras de Freud (APA, 1980).

O TP tem um custo social elevado. Estimativas europeias avaliam que 7,5 a 10% da população terão AP ocasionais e 2% a 5% da população desenvolverão o TP, isto é, AP recorrentes com graves limitações do desempenho social e familiar do indivíduo (Goodwin *et al.*, 2005).

Clinicamente, os AP são episódios agudos de medo, ou sensação similar, que ocorrem de forma recorrente e na ausência de qualquer ameaça identificável. Eles caracterizam-se por uma experiência súbita de ansiedade severa, que atinge intensidade máxima em cerca de 10 min e duram por períodos de até 4 h (Angst e Wicki, 1991). Os principais sintomas dos AP são alterações respiratórias, sensação de sufocamento, desejo de fuga da situação imediata, dor torácica, taquicardia, rubores e calafrios, suor, vertigem, tremores, desfiguração da realidade (*derealization*), despersonalização (*despersonalization*), e sensação de morte iminente ou medo de perder a razão (Klein e Fink, 1962; Klein, 1964; Freedman *et al.*, 1985; Stein *et al.*, 1992; Goetz *et al.*, 1994). Eventualmente, os relatos incluem “reações de congelamento” (sensações de paralisia e bloqueio da marcha) (Cassano e Savino, 1997; Goetz *et al.*, 1994). Notavelmente, a descrição de Freud para o “ataque de angústia” já incluía 10 dos 13 sintomas necessários para o diagnóstico do TP quando este foi introduzido no Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais (DSM-III) (Frances *et al.*, 1993).

Em realidade, o TP é uma síndrome tripartite caracterizada pela ocorrência de 1) ataques espontâneos de pânico, 2) ansiedade antecipatória e

3) esquiva fóbica ou agorafobia. De fato, os pacientes de pânico queixam-se frequentemente de 'ansiedade antecipatória', isto é, do temor de desamparo na eventualidade de um AP, uma condição que pode agravar-se numa agorafobia incapacitante e uma vida de total enclausuramento. Notavelmente alguns pacientes desenvolvem agorafobia após um único ataque de pânico. Como consequência, uma parte considerável dos portadores da síndrome do pânico pára de trabalhar ou até mesmo perde o emprego devido à queda de desempenho (APA, 1980). Contudo, agorafobia é um termo incorreto na medida que os pacientes não têm medo de locais públicos, mas do desamparo na eventualidade de um AP em locais públicos.

Os AP e a ansiedade antecipatória parecem ser devidos a mecanismos relativamente independentes, uma vez que apresentam cursos distintos à terapia com antidepressivos (Klein, 1964). De fato, muito freqüentemente a ansiedade antecipatória continua se manifestando mesmo após o desaparecimento completo dos AP. Conseqüentemente, o desenvolvimento da ansiedade antecipatória tem sido um complicador adicional dos estudos clínicos sobre os mecanismos neurais dos AP propriamente ditos (Hollander *et al.*, 1989; Graeff *et al.*, 2005). O outro complicador destes estudos consiste na alta comorbidade do TP com outras condições psiquiátricas, principalmente, transtornos depressivos e fobias (Angst e Wicki, 1993). Estas dificuldades têm ensejado o desenvolvimento de modelos de AP e TP em animais, nos quais estes fatores podem ser controlados separadamente.

Os critérios operacionais para a definição dos AP e agorafobia foram estabelecidos a partir do DSM-III-R (APA, 1987). Neste, o TP é definido como a ocorrência de 4 ataques espontâneos em 4 semanas, ou 1 ataque

seguido pelo receio de novos ataques ao longo de 4 semanas. Também ficou estabelecida a distinção entre ataques completos, com mais de 4 sintomas, ou ataques limitados, com número inferior de sintomas. O DSM-IV adicionou que os AP também podem ocorrer em outros transtornos de ansiedade (fobias, transtorno de estresse pós-traumático, etc) podendo ser espontâneos ou induzidos pela exposição a objetos fóbicos (aranhas, sangue, cães, etc), ou situações que o predispõem (multidões, locais fechado, altura, etc). Ressaltou, no entanto, que enquanto os ataques espontâneos constituem o elemento central do diagnóstico do TP, os ataques situacionais estão relacionados à expectativa do paciente de sentir-se mal em um determinado local ou contexto. Esta ansiedade é gradual, flutuante e crescente, até que o indivíduo se confronte com a situação temida. Um AP pode, então, ser desencadeado (Gentil, 1986).

Devido à ausência de explicações e as frequentes consultas e exames médicos, geralmente negativos, os AP também causam insegurança e perda da autoestima, com grande desconforto físico e emocional. Embora as bases neurofisiológicas do TP ainda não estejam esclarecidas, é possível realizar o tratamento farmacológico e cognitivo do TP.

Do ponto de vista fisiológico, um dos aspectos mais importantes dos AP é a ausência de respostas dos “hormônios do estresse”, corticotrofina (ACTH), cortisol (CORT) e prolactina (PRL), tanto nos ataques espontâneos (Cameron *et al.*, 1987) e situacionais (Woods *et al.*, 1987) quanto naqueles induzidos por infusão de lactato de sódio ou inalação de CO₂ (Liebowitz *et al.*, 1985; Levin *et al.*, 1987; Woods *et al.*, 1988; Hollander *et al.*, 1989a,b; Kellner *et al.*, 1998). Não obstante, Otte e colaboradores (2002) relataram que a infusão

de lactato de sódio em pacientes de pânico aumenta a secreção de PRL sem alteração dos níveis de ACTH.

Por fim, estudos recentes de epidemiologia clínica sugerem que existência de 2 subtipos de TP, com predominância de sintomas respiratórios ou não-respiratórios (Roberson-Nay e Kendler, 2011).

BASES NEURAIIS DOS ATAQUES DE PÂNICO

Dez anos antes da definição do TP como entidade nosológica independente (APA, 1980), Nashold e colaboradores (1969) conduziram um estudo meticuloso mostrando que a estimulação intracraniana de humanos com eletrodos cronicamente implantados na matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) e regiões adjacentes do teto do mesencéfalo produzia ansiedade, pânico, terror, sentimentos de morte iminente e sinais neurológicos e respostas viscerais que reproduziam os sintomas cardinais dos AP. O raio-X dos eletrodos mostrou que os sítios mais eficazes na produção destes efeitos encontravam-se na metade dorsal da MCPA (MCPD), mas não em sua metade ventral (MCPV) ou nas estruturas adjacentes do teto do mesencéfalo (Nashold *et al.*, 1969). Estes resultados foram confirmados em estudos posteriores (Young, 1989). Adicionalmente, estudos com tomografia por emissão positrônica mostraram que o teto mesencefálico e, possivelmente, a MCPD, é ativado durante AP induzidos por lactato (Reiman *et al.*, 1989).

Em ratos, enquanto a estimulação elétrica ou química da MCPD com estímulos de baixa magnitude produz uma reação de congelamento caracterizada por imobilidade tensa e exoftalmia (protrusão do globo ocular e

abertura máxima das pálpebras), estímulos mais intensos originam um comportamento vigoroso de fuga com galopes e saltos de até 1 m/s e 50 cm de altura, respectivamente (Bittencourt *et al.*, 2004; Schenberg *et al.*, 2005). Estes comportamentos são acompanhados por padrões distintos de respostas cardiovasculares e respiratórias e, menos freqüentemente, micção e defecação (Schenberg *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004). Notavelmente, mostramos que a resposta de galope induzida pela estimulação da MCPD do rato é seletivamente atenuada por panicolíticos clinicamente eficazes administrados em doses e regimes similares aos empregados na terapia do TP (Schenberg *et al.*, 2001, 2002; Vargas *et al.* 2001). Assim, embora as respostas defensivas induzidas por estimulação da MCPD tenham sido indistintamente propostas como um modelo de AP (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin and Graeff, 1991), as evidências farmacológicas sugerem que o galope seja o melhor representante desta condição (Schenberg *et al.*, 2001). Notavelmente, a exposição de ratos a estímulos ultrassônicos na freqüência da vocalização de alarme desta espécie (22-kHz) ativa a MCPD e induz comportamentos de fuga acompanhados de taquicardia e aumento da temperatura corporal, sem alteração dos níveis de corticosterona (Klein *et al.*, 2010). De forma similar, as respostas de fuga de ratos e camundongos têm perfil farmacológico similar ao dos AP, sendo atenuadas pela administração crônica de panicolíticos, mas são insensíveis aos ansiolíticos (Griebel *et al.*, 1996; Blanchard *et al.*, 1997).

A participação da MCPA no TP também é apoiada por estudos de neuroimagem estrutural e funcional. Nos estudos estruturais, os resultados provêm de morfometria baseada em voxel (VBM), um método automatizado de segmentação do cérebro em compartimentos de matéria cinzenta, substância

branca e líquido encéfalo-raquidiano que permite investigar as diferenças nos volumes regionais das estruturas cerebrais. Assim, estudos com VBM mostraram que pacientes com TP apresentam aumentos do volume da MCPA e da ponte rostral em relação aos voluntários sadios (Protopopescu *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2008). Outro estudo avaliou as diferenças volumétricas do mesencéfalo da dorsal (onde se situa a MCPA) e ventral (Fujiwara *et al.*, 2011). Os resultados mostraram que o volume do mesencéfalo dorsal, mas não do ventral, é maior nos pacientes com TP que nos controles sadios. Adicionalmente, o volume do mesencéfalo dorsal correlacionou-se positivamente com a gravidade dos sintomas de pânico, e negativamente com a qualidade de vida em pacientes.

Por outro lado, Mobbs e colaboradores (2007) desenvolveram um modelo em computador no qual o voluntário é caçado e capturado por um predador “inteligente”. Contudo, embora o predador seja virtual, ele pode causar dor real se a fuga não for bem sucedida, aplicando choques aos dedos dos voluntários. Os resultados mostraram que quando a ameaça é potencial, ou seja, quando o predador encontra-se distante da presa/voluntário, a atividade cerebral é maior no córtex pré-frontal medial (CPFm) e na amígdala lateral. Em contraste, quando a ameaça é iminente, ou seja, quando o predador aproxima-se da presa/voluntário, a atividade aumenta na amígdala central e na MCPA. Estes autores também mostraram que o grau de ativação da MCPA correlaciona-se com a sensação de inescapabilidade e intensidade do medo ao predador. Estes resultados sugerem que a ansiedade ativa o CPF e amígdala basolateral, mas inibe a amígdala central e MCPA, ocorrendo o inverso nos estados de medo intenso que se assemelham aos AP. o pânico resulta da

ativação de estruturas do mesencéfalo. Adicionalmente, este estudo sugere que os AP possam ser desencadeados pelo desacoplamento do controle córtico-amigdalóide da MCPA.

Com base nestes e em outros resultados, a MCPD tem sido considerada como um dos melhores candidatos ao substrato neural dos AP (Deakin e Graeff, 1991; Jenck *et al.*, 1995; Graeff *et al.*, 1996; Schenberg *et al.*, 2001, 2002; Vargas e Schenberg, 2001).

Por outro lado, o uso generalizado dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) no tratamento TAG, TP e depressão, sugere que a 5-HT tenha um papel central na modulação destes transtornos. De fato, Deakin & Graeff (1991) apresentaram evidências abundantes de que a serotonina (5-HT) exerça um funções tanto excitatórias quanto na inibitórias nos mecanismos de defesa processados em estruturas prosencefálicas (CPF e amígdala basolateral) e mesencefálicas (MCPD), respectivamente. Além dos estudos mencionados sobre a participação da MCPD nos AP, estes autores basearam-se nos experimentos de LeDoux e colaboradores (para revisão, ver LeDoux, 2012) que demonstraram o papel fundamental da amígdala na aquisição do medo condicionado. Como resultado, Deakin & Graeff (1991) propuseram que os comportamentos passivos de defesa às ameaças potenciais ou distantes, são processados no CPF e amígdala e seriam equivalentes ao TAG. Em contraste, os comportamentos ativos da fuga estariam associados às ameaças próximas e ao TP, e seriam processados na MCPD. Em particular, Deakin e Graeff (1991) postularam que as projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (NDR) ao CPF, amígdala e hipotálamo facilitariam comportamentos passivos de defesa (imobilidade e esquiva),

enquanto as projeções serotoninérgicas à MCPA teriam um papel inibitório das respostas ativas de fuga (trotes, galopes e saltos). Conseqüentemente, os AP seriam devidos ao funcionamento inadequado das projeções serotoninérgicas do NDR à MCPD. Deakin & Graeff (1991) também propuseram que os eferentes serotoninérgicos do núcleo mediano da rafe (NMnR) para o hipocampo seriam o substrato de um “sistema comportamental de resiliência” que separaria os afazeres do dia-a-dia dos eventos aversivos, permitindo que o indivíduo se adaptasse às situações de estresse. A elevação dos níveis de CORT durante o estresse prolongado resultaria na subregulação dos receptores 5-HT_{1A} do hipocampo, causando uma falha no “sistema de resiliência” e desencadeando a depressão. Do ponto de vista do presente estudo, a implicação mais importante desta teoria seria que a 5-HT facilita a ansiedade no CPF e amígdala, mas inibe o pânico na MCPD.

Além de inúmeros experimentos em animais (para revisão ver Graeff *et al.*, 1996; Graeff e Zangrossi, 2010; Graeff, 2004), a hipótese do papel dual da 5-HT foi apoiada por estudos em humanos com o teste simulado de falar em público (TSFP). Neste teste, o participante tem de falar para uma câmera de vídeo enquanto assiste sua própria imagem numa tela de projeção. Este procedimento evoca ansiedade antecipatória antes do início da tarefa e uma condição similar ao medo, ou pânico, durante sua execução. Esta distinção baseia-se em estudos farmacológicos que mostraram que a ansiedade inicial é reduzida pelos benzodiazepínicos, enquanto o medo durante o falar em público é resistente a estes agentes. Contrariamente, o medo de falar em público é afetado pelas drogas serotoninérgicas, um perfil similar ao observado no TP. Por Esta razão, presume-se que o TSFP ative

sistemas emocionais similares aos envolvidos nos AP (Del Ben *et al.*, 2003). De fato, os níveis salivares e plasmáticos de CORT e PRL não foram aumentados durante a execução do TSFP, ocorrendo o contrário na ansiedade antecipatória que precede a execução da tarefa (Garcia Leal *et al.*, 2005, 2010).

Por outro lado, Klein (1993) sugeriu que os AP sejam alarmes falsos de sufocamento. Klein (1993) argumenta que esta hipótese é consistente com a hipersensibilidade dos pacientes de pânico ao lactato de sódio e CO₂, com os AP durante o relaxamento e o sono, com o aumento da frequência dos AP durante o transtorno disfórico da fase lútea (TDFL) e, contrariamente, sua redução na gravidez, parto e lactação. Em realidade, os AP induzidos por CO₂ e lactato permanecem como o melhor modelo clínico de AP, uma vez que não são precipitados em indivíduos sadios (Pitts and McClure, 1967; Klein, 1993) ou em pacientes com transtorno obsessivo-compulsivo (Griez and Schruers, 1998), fobia social (Liebowitz *et al.*, 1985b) e, menos certamente, TAG (Lapierre *et al.*, 1984). Além disso, enquanto os AP induzidos por CO₂ e o lactato de sódio ao pânico são bloqueados pelo tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos (Rifkin *et al.*, 1981; Liebowitz *et al.*, 1985a; Woods *et al.*, 1990; Yeragani *et al.*, 1988; Gorman *et al.*, 1997), a β -carbolina e a ioimbina induzem AP em sujeitos saudáveis e que são bloqueados por baixas doses de diazepam, mas não pelos tricíclicos (Dorow *et al.*, 1983; Klein, 1993). Portanto, segundo esta teoria, os AP seriam devidos a uma interpretação fisiológica incorreta de um sistema de alarme de sufocamento, o qual dispararia de forma não adaptativa.

Evidências recentes do nosso laboratório sugerem que a MCPD também esteja envolvida nas respostas comportamentais ao sufocamento. Assim, Schimitel e colaboradores (2012) mostraram que os sinais de hipóxia produzidos pela estimulação seletiva dos quimiorreceptores por doses subletais de cianeto de potássio (KCN) produzem comportamentos de defesa similares àqueles da estimulação elétrica ou química da MCPD. Mais importante, enquanto doses subliminares de KCN potenciaram as respostas de defesa à estimulação elétrica da MCPD, a lesão desta estrutura aboliu as respostas de defesa à administração isolada do KCN. Embora a exposição ao CO₂ (8% e 13%), isoladamente, inibiu os comportamentos de defesa eliciados pela estimulação da MCPD, a exposição ao CO₂ potencializou as respostas de fuga induzidas pela administração de KCN. Os autores concluíram que a MCPD abriga um sistema de alarme de sufocamento sensível à anóxia, cuja disfunção desencadearia os AP e tornaria os indivíduos hipersensíveis ao CO₂. Este estudo também sugere que o mecanismo fundamental do sistema de alarme de sufocamento esteja relacionado à hipóxia, e não à hipercapnia. Em todo caso, estes resultados são evidências importantes do envolvimento da MCPD nos comportamentos de defesa ao sufocamento (Schimitel *et al.*, 2012). Por fim, Schimitel e colaboradores (2012) sugeriram que os AP do tipo respiratório (sufocamento) e não-respiratório (predatório) são processados pelas colunas dorsolateral (MCPDL) e lateral (MCPL) da MCPA, respectivamente.

O envolvimento da MCPD nos AP também foi sugerido por uma série de estudos conduzidos por Lovick e colaboradores (Lovick, 2006, 2008; Lovick & Devall, 2009) que mostraram que a excitabilidade da MCPA das ratas flutua durante o ciclo estral, tal como é observado em mulheres com TP.

Particularmente, os neurônios da MCPA dorsolateral (MCPDL) apresentaram aumentos significantes na expressão da subunidade alfa-4/beta-1/delta de receptores GABA ao final do diestro (equivalente à fase pré-menstrual em mulheres), quando comparados às outras fases do ciclo estral ou à sua expressão em ratos machos (Lovick, Griffiths, Dunn, & Martin, 2005). Além disto, estes autores mostraram que as subunidades alfa-4/beta-1/delta dos receptores GABA estavam majoritariamente localizadas em neurônios GABA (auto-receptores) da MCPADL (Griffiths e Lovick, 2005a, 2005b). Portanto, como as subunidades alfa-4/beta-1/delta dos receptores GABA apresentam uma sensibilidade excepcional à injeção iontoforética de GABA (Lovick *et al.*, 2005), a sobre-regulação de auto-receptores com esta subunidade provoca uma redução atenuada do tônus inibitório da MCPDL. Portanto, Lovick e colaboradores sugeriram que o aumento da expressão dos auto-receptores alfa-4/beta-1/delta seja um fator primordial para o desenvolvimento do TDFL e da alta comorbidade deste transtorno com os AP (Yonkers, Pearlstein, & Rosenheck, 2003). Este mecanismo explicaria a alta susceptibilidade dos pacientes com TDFL tanto ao CO₂ (Gorman *et al.*, 2001; Kent *et al.*, 2001) quanto aos panicogênicos na fase lútea tardia (Le Mellédo *et al.*, 2000). Adicionalmente, Lovick e colaboradores mostraram que a resposta pressórica, a taquicardia e a taquipnéia produzidas por injeções sistêmicas do panicógeno CCK (pentagastrina) foram aumentadas no diestro. Em ratas no proestro, a resposta pressórica e a taquicardia, mas não a taquipnéia, também foram aumentadas no início do diestro (Brack, Jeffery, & Lovick, 2006). Por fim, registros intracelulares dos neurônios de projeção da MCPD mostraram aumentar a taxa de disparo produzida pela administração intravenosa de

pentagastrina, ou de injeções iontoforéticas de antagonistas GABA-A, aumentou significativamente no estro e fim do diestro, quando comparados ao proestro e início do diestro (Brack e Lovick, 2007).

Estes mecanismos seriam complementares àqueles sugeridos por Smith e Wooley (2004) para a etiologia do TDFL. Os últimos autores sugeriram que enquanto as propriedades neuroexcitantes do estradiol são responsáveis pelo aumento da excitabilidade na metade do ciclo estral, a excitabilidade no início e fim da fase lútea estão associadas às mudanças dos níveis centrais do principal metabólito da progesterona, a alopregnanolona (3 α ,5 α -THP). Contudo, enquanto as injeções agudas de progesterona e alopregnanolona tem efeitos ansiolíticos acentuados em ratos, a exposição de 72 horas à progesterona produz aumentos de ansiedade semelhantes àqueles observados em mulheres durante a elevação inicial da progesterona. Após isso, a ansiedade declina para níveis basais a despeito da exposição prolongada das ratas à progesterona. Contudo, a ansiedade é restaurada pela retirada repentina da progesterona, mimetizando o rápido decaimento deste hormônio que precede a menstruação (Gallo e Smith, 1993; Smith e Wooley, 2004). O aumento da ansiedade no início e fim da fase lútea parecem, portanto, ser devidos à sobre-regulação pela allopregnanolona da subunidade alfa-4 de receptores com baixa sensibilidade ao GABA (Gulinello *et al.*, 2001, 2002; Smith, 2002). Em realidade, o aumento da ansiedade devido à retirada da progesterona em ratos pode ser prevenido pelo bloqueio por indometacina da metabolização da progesterona em alopregnanolona. Assim, em vez da progesterona, a allopregnanolona é o composto ativo (Smith *et al.*, 1998). De fato, os níveis de allopregnanolona de paciente de TDFL tratados foram

significativamente menores no período de melhora comparados com os sujeitos que não apresentaram melhora. A melhora também associou-se significativamente com baixos níveis de allopregnanolona durante a depressão pré menstrual e mudanças no apetite (Freeman, Frye, Rickels, Martin, & Smith, 2002). Portanto, o aumento da incidência de ansiedade e pânico na fase lútea tardia parece ser mediado por efeitos distintos da allopregnanolona na transmissão GABA, isto é, a sobre-regulação da subunidade alfa/4 de receptores GABA-hipossensíveis em áreas que controlam a ansiedade, ou a sobre-regulação da subunidade alfa4/beta1/delta de autoreceptores GABA-hipersensíveis na MCPA, respectivamente. Um terceiro grupo de experimentos examinou efeitos do hipotireoidismo nas respostas de defesa evocada da estimulação da MCPA. (Siqueira, Rossoni, & Schenberg, 2010a; Siqueira, Rossoni, Tiengo, Tufik, & Schenberg, 2010). A relação entre AP e desbalanço hormonal foi originalmente sugerido por Klein (1964) em seu estudo pioneiro sobre a farmacologia do pânico e dos transtornos de ansiedade. Na verdade, 12 dos 14 pacientes do ultimo estudo tiveram seu primeiro AP em contexto de distúrbios endócrinos, incluindo ooforectomia, histerectomia, condições de pré ou pós parto e terapia desequilibrada para hipotireoidismo. Em ordem para clarificar os conflitos os conflitos dos dados clínicos acerca da comorbidade com AP e doenças da tireoide, experimentos realizados recentemente em nosso laboratório mostraram que injeções sistêmicas de baixas dose do hormônio liberador de tireotrofina (TRH, 1 µg/ kg, i.p.) produziu aumento significativo nos limiares das resposta de imobilidade (40%), trote (33%), galope (34%), salto (39%) e exoftalmia (43%) evocadas da estimulação da MCPA. Em contraste, o TRH não teve efeitos na exploração do braço aberto do labirinto

em cruz elevado (LCE) (Siqueira et al., 2010a). Em outro estudo (Siqueira et al., 2010b), os efeitos do agente anti-tireoide, metimazol (MTZ) foi avaliado ou nos comportamentos de pânico induzidos pela estimulação elétrica da MCPA ou nos comportamentos ansiosos de ratos exposto ao EPM. Os dados mostraram que 10 dias de tratamento com MTZ produz marcante aumento dos limiares de exoftalmia (65%), imobilidade (75%), trote (63%), galope (56%), salto (47%), defecação (114%) e micção (85%). Esses efeitos permaneceram mesmo após o fim do tratamento com a droga. Em contrate, MTZ teve efeitos variáveis no LCE que não se correlacionaram com os índices bioquímicos do hipotireoidismo (Siqueira et al., 2010b). Esses estudos suportam a atenuação dos AP no hipotireoidismo. Ainda permanece para ser elucidado se esses efeitos são mediados por projeções de neurônios TRHérgicos da MCPA para NDR ou por uma única população de neurônios TRH na MCPVL. Em qualquer caso, os estudos anteriores sugerem que os experimentos planejados para reproduzir as características clínica do TP ou das comorbidades deste transtorno com outras condições são passos obrigatórios na investigação da neurobiologia dos AP.

Shekhar e colaboradores relataram uma serie de experimentos que procurou um modelo para AP induzido por lactato de sódio em ratos (Johnson & Shekhar, 2006; Johnson, Truitt, Fitz, Lowry, & Shekhar, 2008, Johnson et al., 2010; Molosh et al., 2010; Shekhar, 1994; Shekhar, & Keim, 1997; Shekhar, Keim, Simon, & McBride, 1996; Shekhar et al., 2006). Esses estudos foram baseados em observações prévias que mostraram que a inibição da transmissão GABAérgica do hipotálamo posterior produz aumentos da atividade locomotora “sugestivos de uma reação de fuga” e facilitam tanto a

supressão comportamental em experimentos de conflito quanto a esquiva não-sinalizada de Sidman (Shekhar & DiMicco, 1987; Shekhar, Hingtgen, & DiMicco, 1987; 1990). Contrariamente, injeção do agonista de receptor GABA-A, muscimol, no hipotálamo posterior liberou o comportamento punido (Shekhar et al., 1990). Embora o envolvimento do HDM ter sido descartado em estudos anteriores, novos experimentos identificaram locais efetivos neste núcleo (Shekhar et al., 1993). Os últimos estudos também mostraram que o bloqueio ou a facilitação da transmissão GABA-A no HDM produz aumento ou diminuição da ansiedade no LCE, respectivamente.

Os estudos seguintes de Shekhar abriram perspectivas inéditas na medida em que mostraram que os comportamentos evocados do HDM são bloqueados pelo tratamento subcrônico com panicolíticos clinicamente eficazes, imipramina (5 and 15 mg/kg, 7 dias) e clonazepam (5 mg/kg, 3 dias). Além de apoiar a mediação do HDM nos AP (Shekhar, 1994), esses dados foram corroborados por estudos mostrando que infusão crônica osmoticamente dirigida de inibidor da síntese GABA (allilglicina) no HDM tornaram os ratos sensíveis a administração intravenosa de lactato de sódio.5 M (10 ml/kg/15 min), mostrou aumento significativo da frequência cardíaca, pressão sanguínea e ansiedade medidas através do teste de interação social (IS) e do testes EPM (Shekhar et al., 2006). Resposta induzida pelo lactato também foram bloqueados por antagonista de receptor ionotrópico ou metabotrópico glutamatergicos no HDM, e por microinjeções de tetrotoxina no órgão vascular da lamina terminal (OVLT) (mas não no órgão subfornical) (Shekhar & Keim, 1997). Adicionalmente, resposta induzidas por lactato em ratos predisposto ao pânico foram facilitadas pela injeção periférica de ioimbina (Shekhar, Sajdyk,

Keim, Yoder, & Sanders, 1999, Shekhar et al., 2006), mas bloqueada por alprazolam (Shekhar & Keim, 2000). O envolvimento da amígdala nos efeitos autonômicos e comportamentais induzidos pelo lactato foram reproduzidos em ratos sujeitos ao kindling químico da amígdala através de repetidas microinjeções dentro da amígdala basolateral (BLA) antagonista de receptor GABA-A ou urocortina, um análogo do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (Sajdyk, Schober, Gehlert, & Shekhar, 1999; Sajdyk & Shekhar, 2000).

Entretanto, estudos recentes de Shekhar's aumentou as dúvidas acerca da homologia dos AP induzidos por lactato em ratos e humanos. Primeiro, Johnson e Shekhar (2006) registraram que enquanto que as respostas evocadas pelo lactato de sódio foram facilitadas por microinjeções de angiotensina II no HDM, elas foram atenuadas pelos antagonista de angiotensina II, saralazine (não-seletivo) e losartan (seletivo tipo-1). Estes autores concluíram que o lactato ativa projeções angiotensinogênicas do OVLM para neurônio do HDM, que por sua vez se projeta para o BNST e CeA para mediar comportamentos ansiosos, e para núcleos simpáticos e parassimpáticos cerebrais para mediar respostas cardiovascular e respiratória, componentes da resposta do pânico. Após isso, Johnson e colaboradores. (2010) mostrou que as repostas induzidas por lactato foram bloqueadas pelo antagonista e o silenciamento do gene para receptor de orexina-1. No seu conjunto, os últimos estudos sugerem que as repostas induzidas por lactato em ratos predispostos foram mediadas pela angiotensina e peptídeo orexina que se acredita ter papel crucial na sede (Antunes-Rodrigues, Elias, Valença, & McCann, 2004;), alimentação (Rodgers, Ishii, Halford, & Blundell, 2002) e, no caso da orexina, na vigília (Siegel, 1999; Taheri, Zeitzer, & Mignot, 2002). A

relação das respostas induzidas por lactato em ratos e os mecanismo da sede foi ainda sugerido pelo achado de Molosh e colaboradores. (2010) mostrando que os comportamentos de pânico em ratos predisposto também foram produzidos por infusão intravenosa de cloreto de sódio a .5 M. Devido a infusão iso-osmolar de D-manitol ter sido ineficazes, eles concluíram que os AP resulta na ativação de vias osmosensíveis pelo aumento da concentração de sódio, mas não de lactato. No entanto, Kellner e colaboradores. (1998) demonstrou que nem os paciente TP, nem os sujeitos controles apresentaram AP durante a infusão intravenosa de solução de cloreto de sódio (2.7%) iso-osmolar para .5 M lactato de sódio. Portanto, embora não se possa descartar o envolvimento da angiotensina II e da orexina no estado ansioso que acompanham distúrbios da sede, fome e raiva, as resposta induzidas por lactato em “ratos propensos” não são melhor modelo para reproduzir o pânico na clínica. Atualmente, o efeito comportamental da infusão de lactato foram avaliados em procedimentos que se acredita representar modelo de GAD mas não de AP. Há duas razões a mais que tornam improvável a participação do DMH nos AP. Primeiro, embora a estimulação química do DMH em ratos anestesiados com pentobarbital produzir apenas um pequeno aumento nos níveis plasmáticos de ACTH (70%) e CORT (80%), sua estimulação em ratos conscientes eleva os níveis plasmáticos de ACTH em cerca 600% (Zaretskaia, Zaretsky, Shekhar, & DiMicco, 2002). Segundo, estudos recentes de nosso laboratório mostraram que enquanto a estimulação elétrica do DMH com pulsos de onda de baixa resolução e intensidade variável elicia todas as respostas de defesa no rato (incluindo os comportamentos de pânico de galope e salto), a estimulação com pulsos de onde de alta resolução e frequência variável produziu somente

exoftalmia na porção difusa do HDM (HDMd) ou exoftalmia, imobilidade, defecação e micção na porção compacta HDM (HDMc). As últimas respostas foram também observadas após a estimulação química com baixa resolução HDMd com NMDA. No entanto, na presença de alimentos, a estimulação elétrica ou química do HDMd elicia robusto comportamento ingestivo dependente da intensidade e da dose em ratos saciados. Contrariamente, todo o repertório de comportamento defensivo dos ratos, incluindo a resposta de galope e salto, foi produzido em três ratos no qual o eletrodo foi inadvertidamente implantado na divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial (HVM) (Alves, 2007). Esses dados sugerem que o comportamento defensivo induzidos pela estimulação do HDMd foram mais provavelmente devido a fuga da corrente para o último núcleo. Embora esses dados apoiem o envolvimento do “capuz” do HVM na expressão dos comportamentos defensivos (Blanchard et al., 2005), eles sugerem a participação limitada do HDMc se houver. De fato, estudo recente mostrou que a estimulação elétrica do HVM em humanos produz AP (Wilent et al., 2010).

COMORBIDADE DO TRANSTORNO DE PÂNICO

Em seu estudo seminal sobre a farmacoterapia do TP, Donald Klein (1964) observou que 50% dos pacientes hospitalizados sofreram ansiedade de separação severa na infância que, freqüentemente, impediu-os de comparecer à escola. Mais recentemente, Rachel Klein (1995) relatou que o aumento da freqüência de AP na idade adulta foi o único achado significativo num estudo duplo-cego de *follow-up* baseado em entrevistas clínicas de

crianças com sintomas definidos de ansiedade de separação (recusa escolar). De fato, predispõem tanto para depressão e pânico em indivíduos adultos (Klein, 1964; Gittelman-Klein and Klein, 1971; Battaglia et al., 1995; Klein, 1995; Aschenbrand et al., 2003; Preter and Klein, 2007; Roberson-Nay et al., 2012). Pânico e depressão são altamente comorbidos (Angst e Wicki, 1993; Gorman e Coplan, 1996; Ballenger, 1998; Kaufman and Charney, 2000). Na verdade, crianças com SAD, filhos de pais com PD apresentam resposta ventilatória para hipercapnia similar aquelas observadas em pacientes adultos com pânico (Roberson-Nay et al., 2010). A susceptibilidade da SAD para PD foi recentemente apoiada por estudo em animais mostrando que a resposta ventilatória à hipercapnia é facilitada tanto em camundongos quanto em ratos que foram sujeitos a um ambiente familiar instável (cross-fostering) e isolamento social neonatal (NSI), respectivamente (Kinkead et al., 2005; Genest et al., 2007a,b; Dumont et al., 2011; D'Amato et al., 2011). De fato, experimentos com ratos recém-nascidos mostram que o desenvolvimento do cérebro é altamente sensível ao estresse de separação materna e que o comportamento e estímulos da mãe têm efeitos marcantes no desenvolvimento do sistema nervoso do filhote. Assim, muitas evidências mostram que a separação induz vocalização ultrassônica e respostas neuroendócrinas que são marcadamente afetados pelos cuidados da mãe, como a alimentação e carícias urogenitais, térmicas, tátil e sinais olfatórios tanto da mãe quanto dos filhotes (Winslow and Insel, 1991; Suchecki et al., 1993a,b; Cirulli et al., 1994; Hofer, 1996; Hofer et al., 1994, 1999; Kuhn and Schanberg, 1998; Levine, 2001; Okimoto et al., 2002; Shair et al., 2003; Neumann et al., 2005; Wohr and Schwarting, 2008; Oreland et al. 2009). Adicionalmente, dados não publicados do nosso laboratório

(Quintino dos Santos, 2011) mostraram que ratos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN), apresentaram robusta facilitação dos comportamentos de pânico evocados pela estimulação da MCPA. Portanto, a intensidade dos limiares foram significativamente reduzidos para exoftalmia (-28%), imobilidade (-20%), trote (-17%), galope (-20%) e salto (-13%) em relação aos controles. Contrariamente, os grupos não diferiram a respeito dos limiares de defecação ou micção. Os últimos dados de acordo com os estudos anteriores sugerem que os comportamentos evocados da MCPA de imobilidade e fuga são mediados por sistemas separados daqueles observados para defecação e micção (Schenberg et al., 2000, 2001; Schimitel et al., 2012). Não conhecidamente, urgências de defecação e micção nunca foram experienciados pelos pacientes durante AP (D.F. Klein, comunicação pessoal), nem reconhecido como sintomas típico de pânico clínico (APA, 2000; WHO, 1993).

Rachel Klein (1995) também observou um aumento significativo de internações devidas a episódios depressivos e um aumento marginal ($P < 0,10$) na incidência de depressão no estudo de follow-up de crianças com ASI. Contudo, no desamparo aprendido (DA, *learned helplessness*), um modelo de depressão reativa baseado na exposição de ratos a choques inescapáveis, Quintino dos Santos (2011) observou aumentos acentuados dos limiares de imobilidade, trote e galope 6 dias após a aquisição do DA.

Estes resultados sugerem que o TP seja predisposto pela ASI, mas não pela depressão reativa. Os efeitos distintos do ISN e DA na MCPA foram evidenciados pelo estudo recente de Rosa (2012) que mostrou que enquanto os níveis de 5-HT e 5-HIAA da MCPA de ratos adultos que foram

submetidos ao ISN não diferiram dos controles, os ratos expostos aos choques escapáveis (CE) apresentaram aumentos significantes dos níveis de 5-HT na MCPA dorsal, e ratos expostos aos choques inescapáveis (CI) aumentos de 5-HT na MCPA ventrolateral. Como não foram observadas alterações significantes nos níveis da 5-HIAA, o aumento da taxa de renovação foi provavelmente devido ao aumento na síntese de 5-HT. Estes dados sugerem que os efeitos tardios do DA (mas não do ISN) sobre as respostas de defesa, podem ser devidos aos aumentos diferenciados dos níveis de 5-HT nas divisões dorsal e ventrolateral da MCPA, respectivamente. Além de adicionarem novas evidências da mediação dos AP pela MCPD, estes estudos preparam o cenário para o desenvolvimento de modelos translacionais abrangentes do TP, envolvendo tanto as causas primárias relacionadas à fisiopatologia do desenvolvimento infantil do paciente de pânico como as causas secundárias de deflagração dos AP na vida adulta.

Preter e Klein (2008) sugeriram que a comorbidade entre TP e ASI pode ser explicada por uma anormalidade do sistema opioidérgico, uma vez que este tem um papel fundamental tanto na respiração quanto nas relações parentais. De fato, os estudos pioneiros de Panksepp e colaboradores (1997) mostraram que o sistema opioidérgico regula as emoções resultantes do isolamento social, uma vez que a administração de doses baixas de opióides reduziu a vocalização e agitação motora de filhotes durante os períodos de isolamento. Por outro lado, estudos recentes em humanos mostraram que a infusão de naloxona seguida de lactato de sódio em indivíduos saudáveis produziu alterações respiratórias semelhantes às observadas durante os AP (Sinha *et al.*, 2007; Preter *et al.*, 2011). Estes estudos levantaram a questão da

interação dos sistemas opiodérgico e serotoninérgico da MCPD. De fato, estudos recentes em ratos mostraram que o efeito panicolítico da administração crônica de fluoxetina no labirinto-em-T elevado (aumento da latência de fuga do braço aberto) foi antagonizado pela administração de naloxona, tanto sistêmica quanto microinjetada na MCPD (Roncon *et al.*, 2012). Estes resultados sugerem que os efeitos antipânico da fluoxetina são mediados pelo sistema opióide endógeno da MCPD. De fato, a administração prévia de naloxona na MCPD antagonizou o efeito panicolítico agudo da microinjeção de 5-HT nesta estrutura. Estes estudos são um passo importante na conciliação das hipóteses de Deakin e Graeff (1991) e Klein e colaboradores (Klein, 1993; Preter e Klein, 2007).

Por outro lado, cerca de 50% dos pacientes com depressão maior apresentam hipercortisolemia e 40% apresentam resposta aumentada de ACTH no teste de dexametasona/CRH (Sachar *et al.*, 1980; Erhardt *et al.*, 2006). De fato, alguns estudos sugerem que a hiperfunção do eixo HHA nos pacientes depressivos possa envolver algum tipo de predisposição genética (Holsboer, 2000). Em adição, a privação materna em ratos e camundongos facilita as respostas do eixo HHA ao estresse tanto antes quanto após o desmame (Lippmann *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 1986). Assim, embora os AP não ativem o eixo HHA, eles podem ser facilitados pela ativação concorrente do eixo em situações estressantes. Estes e outros estudos justificam o exame pormenorizado das relações do estresse com o TP, como veremos adiante.

TRANSTORNO DO ESTRESSE

A teoria do estresse de Hans Selye (1950) teve um impacto enorme na prática médica e suas implicações foram intensivamente debatidas por quase um século. Selye, conceituou o “estresse” como uma reação inespecífica do organismo, a “síndrome geral de adaptação”, a uma demanda intensa, tanto interna quanto externa, física ou psicológica, que colocaria em risco o equilíbrio (homeostase) do meio interno. A noção de “inespecificidade” da resposta de estresse foi desenvolvida a partir de observação de que a atividade do córtex adrenal, bem como a ocorrência de úlceras gástricas e a involução timo-linfática, são aumentadas por uma extensa gama de estímulos, incluindo trauma, hemorragia, queimaduras, calor, frio, raio-X, exercício muscular, anóxia, infecção, estímulos psicológicos e vários tipos de drogas. Estudos posteriores mostraram que a resposta aguda aos estressores inclui a descarga maciça de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), com o conseqüente aumento da secreção de ACTH e CORT (cortisol em primatas, ou corticosterona em roedores) e a ativação acentuada do sistema nervoso simpático. Posteriormente, observou-se que a PRL também é consistentemente liberada no estresse agudo (Neill, 1970; Siegel *et al.*, 1980; Dijkstra *et al.*, 1992; Krulich *et al.*, 1974; Mioduszewski *et al.*, 1982).

Segundo Selye, a síndrome geral de adaptação desenvolver-se-ia em 3 estágios. O primeiro estágio consistiria na “reação de alarme”, uma descarga maciça de hormônios adrenais, com alterações dramáticas dos mecanismos homeostáticos, incluindo distúrbios da pressão sanguínea, dos níveis circulantes de glicose, balanço eletrolítico, alterações da permeabilidade

da membrana, etc. Havendo a persistência do estresse, a síndrome evoluiria para o “estágio de resistência”. Nesta fase, a secreção de CORT permaneceria alta, porém estável, e o organismo se adaptaria ao estresse, com a consequente melhora ou desaparecimento dos sintomas. Finalmente, se o estímulo estressor permanecesse por um período suficientemente longo, a síndrome evoluiria para um terceiro estágio, o “estágio de exaustão”, no qual a hipófise e adrenais esgotariam seus hormônios e o organismo perderia a capacidade de adaptação. Neste estágio, característico de estresse severo e/ou duradouro, as defesas do organismo seriam arruinadas, levando ao reaparecimento dos sintomas e ao colapso de funções e órgãos vulneráveis, principalmente, a função imunológica e o trato gastrointestinal, podendo ser fatal. Num certo sentido, a terceira fase poderia ser chamada de “síndrome geral de desadaptação”. Apesar da associação usual dos efeitos nocivos do estresse aos estágios finais da síndrome geral de adaptação (resistência e exaustão), estes efeitos também podem ocorrer em episódios agudos, desde que suficientemente intensos.

Portanto, em oposição ao postulado de Koch de que toda doença tem uma causa específica, Selye ressaltou a importância de causas inespecíficas denominadas genericamente de “estressores”. Por outro lado, enquanto Cannon examinou o sentido adaptativo das respostas viscerais que acompanham as reações de fuga e luta (*emergency reactions*); Selye ressaltou os aspectos nocivos do estresse intenso ou prolongado. Como resultado, enquanto o primeiro cunhou o conceito de “homeostase” para definir o conjunto de reflexos que visa à manutenção da estabilidade do meio interno (o “*milieu interieur*” de Claude Bernard), o segundo desenvolveu o conceito de “estresse”

para caracterizar o desequilíbrio do meio interno produzido pelas agressões ao organismo.

Recentemente, foi introduzido um novo termo na literatura de estresse, a “alostase”. Resumidamente, enquanto a homeostase é definida como a variação de um sistema fisiológico entre limites bastante restritos, a alostase considera que estes limites podem ser redefinidos em vista de modificações do estado do organismo.(por exemplo, obesidade, hipertensão, exercício, etc). Neste contexto, também foram introduzidos os conceitos de “carga alostática” e “sobrecarga alostática” para referir-se ao custo do estresse para o organismo, incluindo o desenvolvimento de doenças graves no segundo caso (McEwen e Wingfield, 2003; Peters e McEwen, 2012).

Por outro lado, a “inespecificidade” da resposta de estresse foi criticada por vários autores (Mason, 1971; Pacak *et al.*, 1998). Em particular, Pacak e colaboradores (1998) testaram esta hipótese verificando se variações na intensidade de diversos tipos de estressores originariam variações proporcionais similares das respostas simpáticas e neuroendócrinas. Contrariamente, no entanto, estes autores observaram que tipos diferentes de estressores (hemorragia, insulina, injeções subcutâneas de formaldeído, frio, ou imobilização) produzem padrões distintos de respostas neuroendócrinas e simpáticas. Adicionalmente, estas respostas não variaram de forma homogênea a variações similares da intensidade dos estressores. Assim, comparados aos aumentos do ACTH, o frio eliciou respostas maiores de norepinefrina (NE), a insulina respostas maiores de epinefrina (EPI), e a hemorragia respostas reduzidas de ambas as catecolaminas. Em contraste, a

imobilização eliciou respostas acentuadas dos 3 hormônios. Estes resultados sugeriram que cada estressor tem uma “assinatura” neuroendócrina.

Qualquer que seja o caso, a característica fundamental do estresse é o aumento da síntese e secreção de CRH, ACTH e CORT na divisão parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), na hipófise anterior e na zona fasciculada do córtex adrenal, respectivamente. Contudo, enquanto a hidrocortisona e o cortisol (95% da atividade) são os principais glicocorticóides em primatas, a corticosterona é o glicocorticóide predominante em roedores. Dentre os efeitos mais conhecidos dos CORT destacam-se o incremento acentuado da neoglicogênese (6 a 10 vezes), aumentando os depósitos hepáticos de glicogênio e mobilizando as proteínas do músculo esquelético e os ácidos graxos do tecido adiposo, e a estimulação de hormônios glicolíticos, como a EPI e o glucagon, garantindo o suprimento energético do organismo e, principalmente, do cérebro, durante a resposta de estresse. Os glicocorticóides também facilitam as ações vasculares e cardíacas das catecolaminas, preparando o sistema cardiovascular para uma eventual sobrecarga.

Os glicocorticóides têm dois modos de ações: permissivo ou protetor. No modo permissivo, os glicocorticóides (a) mantêm a atividade basal do eixo HHA, (b) ajustam o limiar de ativação do eixo HHA ao estresse e (c) inicializam (*priming*) os mecanismos de defesa dos organismos. Por exemplo, os glicocorticóides facilitam os efeitos das catecolaminas no metabolismo lipídico e glicolítico, sobre-regulam (*upregulation*) a expressão dos receptores da inflamação e agem centralmente nos processos de atenção, integração da informação sensorial e seleção de respostas (Buckley, 2000). No segundo

modo, supressivo ou protetor, as ações dos glicocorticóides capacitam o organismo para lidar, ou adaptar-se, ao estresse, assim como na sua recuperação. As ações anti-inflamatórias e imunossupressoras dos glicocorticóides são características centrais deste modo de atividade, impedindo que respostas imunológicas exageradas causem danos ao organismo. Outras ações protetoras importantes incluem a habilidade dos esteróides em redirecionar o metabolismo para atender as demandas energéticas do estresse e o exercício de funções cerebrais importantes, inibindo funções irrelevantes nas condições de estresse, tais como, o crescimento e funções reprodutoras (Gray 1991).

As ações permissivas dos esteróides ocorrem em concentrações fisiológicas reduzidas e são majoritariamente mediadas pelos receptores de alta afinidade (receptor tipo-I ou mineralocorticóide, MR). Em contraste, as ações supressivas ocorrem na vigência das concentrações elevadas de glicocorticóides do estresse e são mediadas por receptores de baixa afinidade (receptor tipo-II ou glicocorticóide, GR) (Buckingan, 2000)

O funcionamento do eixo HHA é controlado por alças de retroalimentação (*feedback*) negativa mediadas por ambos os tipos de receptores (McEwen, 1991) tanto ao nível de hipotálamo e hipófise (De Kloet, 1995) quanto nas estruturas supra-hipotalâmicas (De Kloet *et al.*, 1986; Gesing *et al.*, 2001; Meaney *et al.*, 1996; Meijer e De Kloet, 1998; Reul *et al.*, 1990). Os MR apresentam alta especificidade e ligam-se seletivamente à CORT. No encéfalo, os MR estão localizados mais densamente nos neurônios do septo e hipocampo e são descritos como receptores de “alta-afinidade” e “baixa-capacidade”. Contrariamente, os GR têm “baixa-afinidade” e “alta-capacidade”.

Os receptores GR estão extensamente distribuídos no encéfalo, incluindo o hipocampo, hipotálamo e células da hipófise. As características complementares destes receptores conferem-lhes papéis distintos na regulação eixo HHA. Assim, enquanto os MR operam em presença de concentrações reduzidas de CORT e exercem o controle basal do eixo HHA, os GR são ativados nas concentrações elevadas de CORT e desempenham um papel fundamental em situações de estresse (De Kloet *et al.*, 1988; McEwen 1991).

Embora o eixo HHA seja tonicamente inibido pelas aferências hipocámpais do PVN (McEwen,1982; Axelrod *et al.*,1984; Kim *et al.*, 2002) as projeções da amígdala e hipotálamo a este núcleo têm uma função fundamental nas respostas neuroendócrinas ao estresse (Helmstetter.,1992; Adamec *et al.*, 1999). Estas estruturas desenvolvem plasticidade neuronal e podem ser responsáveis pela hiperfunção do eixo em diversos transtornos psiquiátricos, incluindo o pânico e a depressão (Erhardt *et al.*, 2006). Provavelmente, a plasticidade deve-se à convergência das aferências do PVN, excitatórias ou inibitórias da secreção do hormônio liberador da corticotrofina (CRF) (Whitnall *et al.*, 1993) e da vasopressina (AVP) (Antoni *et al.*, 1993), os principais secretagogos do ACTH (Dallman *et al.*, 1987). Um exemplo característico da plasticidade do eixo HHA consiste na observação de que animais submetidos a estresse crônico exibem respostas neuroendócrinas normais, ou até mesmo aumentadas, a um novo estressor, a despeito do intenso *feedback* negativo devido aos níveis elevados de glicocorticoides do estresse crônico (Akana *et al.*,1997, Bhatnagar *et al.*, 1995, Ottenwille *et al.*, 1989, Scribner *et al.*, 1991).

No mesmo sentido, vários estudos mostram que o funcionamento do eixo HHA pode ser “programado” em idade bastante precoce, corroborando a associação bastante freqüente de adversidades na infância e transtornos psiquiátricos na vida adulta (Bowlby, 1973). Em particular, embora os ratos com duas semanas de vida apresentem níveis basais e respostas reduzidas de CORT que são característicos do “período hiporresponsivo ao estresse” (SHRP, *stress hyporesponsive period*) (Schapiro *et al.*, 1962; Levine, 1994, 2001, 2002), eles tornam-se sensíveis a um estresse moderado (injeção de salina) após a separação maternal de cerca de 24 h. De fato, embora o CRF e AVP já sejam detectados na última semana de gestação (Emanuel *et al.*, 1989), a mãe exerce uma poderosa inibição do eixo HHA. Dentre os estímulos maternos que controlam o eixo HHA do filhote, as carícias anogenitais inibem o PVN, a alimentação inibe a resposta adrenal ao ACTH, e o contato passivo inibe a resposta do eixo HHA ao estresse (Suchecki *et al.*, 1993; Levine, 2001). Adicionalmente, enquanto os filhotes manuseados e/ou submetidos à separação maternal breve (3-15 min) apresentam respostas neuroendócrinas atenuadas na vida adulta, filhotes submetidos à privação materna por períodos prolongados (24 h) apresentam respostas exageradas ao estresse, tanto durante o SHRP quanto na vida adulta (Suchecki *et al.*, 1993; Levine, 2001, 2002; Lippmann *et al.* 2007;. Walker *et al.*, 1986). Notavelmente, como o CRH é sub-regulado nos filhotes privados, a hiperfunção do eixo HHA nestes filhotes deve-se, aparentemente, à AVP (Levine, 2001)

Conforme mencionamos, evidências abundantes sugerem que os hormônios do estresse (ACTH, CORT e PRL) não são aumentados, ou possam ser até mesmo inibidos, pelo estresse inquestionável do AP (Liebowitz *et al.*,

1985 a; Levin *et al.*, 1987; Woods *et al.*, 1987, 1988; Hollander *et al.*, 1989a,b; Kellner *et al.*, 1998). De fato, a infusão de lactato de sódio aumenta os níveis plasmáticos do fator natriurético atrial (FNA), um inibidor fisiológico da secreção de CRH (Kellner *et al.*, 1998). Por outro lado, embora a inibição do eixo HHA durante comportamentos emocionais seja um fenômeno bastante raro, Levine e colaboradores (Conner *et al.*, 1971; Erskine e Levine, 1973) mostraram que o aumento da secreção de ACTH devido à aplicação de choques nas patas é atenuado se os choques forem aplicados na presença de outro rato, induzindo o comportamento de luta (*shock-induced aggression*).

Além da ativação do eixo HHA, o estresse aumenta a liberação de PRL tanto em humanos quanto em animais (Euker *et al.*, 1975; Meyerhoff *et al.*, 1988; Lamberts & Macleod, 1990; De Giorgi *et al.*, 1992; Biondi e Picardi, 1999; Freeman *et al.*, 2000; Fujikawa *et al.*, 2004; Rossier *et al.*, 1980). A PRL é um polipeptídeo com ampla atividade biológica sintetizado e secretado pelos lactotrófos da hipófise anterior (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 2000). O núcleo arqueado do hipotálamo tem um papel fundamental na regulação da secreção da PRL induzida pela amamentação ou estímulos olfativos, auditivos, luminosos e estressores. Os neurônios dopaminérgicos deste núcleo (sistema dopaminérgico túbero-infundibular) fazem contato sináptico com capilares na eminência mediana onde a dopamina (DA) é liberada e transportada ao lobo anterior da pituitária. Na pituitária, a DA ativa receptores D2 pós-sinápticos dos lactotrófos, inibindo a liberação de PRL (Durham *et al.*, 1997; Pilotte *et al.*, 1981). Além da DA, a secreção de PRL é controlada por fatores endógenos, principalmente, estrogênio (Caron *et al.*, 1996, 1997), hormônio liberador da tireotrofina (Schwinn *et al.*, 1976; Freeman *et al.*, 2000) e peptídeo liberador de

PRL (PrRP), sintetizado principalmente no hipotálamo dorsomedial (HDM) (Hinuma *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 1999; Tokita *et al.*, 1999). Embora a microinjeção de PrRP no PVN aumente os níveis circulantes de glicocorticóides (Matsumoto *et al.*, 2000; Mera *et al.*, 2006), lesões dos neurônios serotonérgicos do núcleo dorsal da rafe e do hipotálamo reduzem a secreção de CORT a estressores psicológicos (medo condicionado) e físicos (luz intensa) sem interferir na resposta de PRL (Van der Kar *et al.*; 1984). Portanto, a resposta de PRL ao estresse parece ser independente das influências serotonérgicas no PVN. Adicionalmente, embora o estresse aumente a secreção de PRL e glicocorticóides, o aumento da secreção basal de PRL pela adrenalectomia é revertido pelos glicocorticóides (Freeman *et al.*, 2000). Por fim, a secreção de PRL é aumentada pelo bloqueio dos receptores glicocorticóides por mifepristona (Van de Schoot *et al.*, 1990). Portanto, embora a função da resposta de PRL ao estresse permaneça desconhecida, o aumento da secreção deste hormônio no estresse é fundamental como um marcador fisiológico independente do eixo HHA. Neste sentido, é importante notar que a secreção de PRL permanece inalterada nos AP induzidos por lactato de sódio (Carr *et al.*, 1986; Hollander *et al.*, 1989). Contrariamente, no entanto, Otte e colaboradores (2002) relataram que a infusão de lactato de sódio em pacientes de TP produziu aumentos significantes dos níveis plasmáticos de PRL em pacientes de pânico sem alteração dos níveis de ACTH. O CRF também estimula a secreção de PRL (Wiedemann *et al.*, 1995). Portanto, a ausência das respostas do eixo HHA e PRL nos AP poderia ser devida, ainda que parcialmente, à inibição da secreção de CRF pelos níveis elevados de FNA destes pacientes (Kellner *et al.*, 1995; Kellner and Wiedemann, 1998;

Wiedemann *et al.*, 2001). De fato, o FNA inibe a liberação de CRF abolindo a resposta de ACTH no AP (Wiedemann *et al.*, 2000).

Embora, a liberação da PRL durante a resposta de estresse tenha sido bem documentada, o mecanismo de regulação desta resposta e o papel da PRL no estresse permanecem obscuros. Do ponto de vista médico, a redução da resposta imunológica é um dos efeitos mais importantes do estresse (Turnbull *et al.*, 1999). Como a PRL estimula a resposta imunológica mediada por fatores tanto humorais quanto celulares (Kooijman *et al.*, 1996; Yu-Lee *et al.*, 2002; Corbacho *et al.*, 2004), o aumento da secreção de PRL no estresse pode ser um fator protetor do organismo às ações imunossupressoras dos glicocorticóides (Gala, 1990; Berczi 1994; Freeman *et al.*, 2000). Esta hipótese é apoiada por estudos *in vivo* que mostraram os efeitos protetores da PRL na produção de mediadores inflamatórios após traumas induzidos por hemorragia, queimaduras e administração de glicocorticóides (Corbacho *et al.*, 2004).

TRANSTORNO DE PÂNICO E ESTRESSE

A demonstração de que os hormônios do estresse não são alterados nos AP constitui-se num dos achados mais desnorteantes da psiquiatria contemporânea (Liebowitz *et al.*, 1985; Levin *et al.*, 1987; Woods *et al.*, 1987, 1988; Hollander *et al.*, 1989a,b,c; Kellner *et al.*, 1998). Não obstante, estudos clínicos e experimentais implicam o estresse tanto na etiologia do pânico quanto da depressão (Strohle e Holsboer, 2003). De fato, várias evidências sugerem que o eixo HHA dos pacientes de pânico esteja hiperativo nas condições de repouso. Em particular, pacientes de pânico apresentam

respostas exageradas do ACTH à administração do CRH um dia após supressão periférica do eixo por dexametasona (teste dexta/CRH) (Schreiber *et al.*, 1996; Erhardt *et al.*, 2006). Portanto, a hiporresponsividade do eixo HHA ao estrEstes agudo dos AP poderia ser devida a adaptações do eixo devidas à sua ativação crônica nos pacientes de pânico.

Contudo, como os AP são imprevisíveis, a ausência das respostas neuroendócrinas foi principalmente observada no pânico induzido por lactato de sódio ou CO₂. Conseqüentemente, estes estudos levantaram a questão se a ausência destas respostas poderia ser estendida aos ataques espontâneos da clínica. De fato, num dos raros estudos com ataques espontâneos de pânico, Cameron e colaboradores (1987) relataram que não houve nenhuma alteração significativa nos níveis de CORT ou PRL, tanto no auge das crises quanto 10 e 60 min após nove AP de pacientes hospitalizados. De forma similar, Woods e colaboradores (1987) não observaram aumento algum dos hormônios do estresse após os AP espontâneos de pacientes agorafóbicos não-tratados. Em realidade, as respostas de PRL do último estudo foram ligeiramente inferiores nos pacientes de pânico em relação aos indivíduos saudáveis. No mesmo sentido, estudos recentes mostraram as respostas de CORT estão atenuadas tanto nos pacientes de TP durante o estresse hipoglicêmico (Jezova *et al.*, 2010), quanto nos pacientes agorafóbicos no estresse situacional da terapia de exposição (*flooding*) (Siegmund *et al.*, 2011). Por fim, Anegg e colaboradores (2002) relataram que enquanto os níveis plasmáticos de PRL permaneceram inalterados, os níveis salivares de CORT diminuíram durante os AP naturais induzidos pela simulação do esgotamento do oxigênio do equipamento de mergulhadores em

treinos de emergência. Embora a redução do CORT salivar possa ter sido devida à lavagem da boca durante o mergulho, os níveis plasmáticos de PRL dos mergulhadores que não “entraram em pânico” foram significativamente maiores que aqueles que apresentaram os ataques. Este estudo é particularmente importante em vista da similaridade das situações de emergência destes mergulhadores com o risco de sufocamento (Klein, 1993).

No mesmo sentido, Garcia-Leal e colaboradores (2005) mostraram que o teste do falar em público simulado não é acompanhado por aumentos do CORT salivar, validando seu emprego como um modelo de AP. Petrowski e colaboradores (2010) encontraram resultados similares no teste de estresse psicossocial de Trier (falar em público seguido da avaliação de desempenho num problema de aritmética). Estes autores mostraram que enquanto a resposta de CORT foi atenuada nos pacientes de pânico submetidos ao estresse psicossocial, a resposta de CORT ao despertar não diferiu dos indivíduos sadios, sugerindo que os pacientes de pânico têm uma anormalidade específica da resposta do eixo HHA ao estresse psicossocial. Em outro estudo, Petrowski e colaboradores (2012) mostraram que a atenuação da resposta de CORT ao estresse psicossocial também foi observada em pacientes que sofreram apenas um ou dois AP. Em contraste, pacientes com TP há mais de 2 anos apresentaram respostas mais acentuadas de CORT no teste dexametasona/CRH. Estes resultados tornam improvável a habituação do eixo HHA pela recorrência dos AP.

Embora Targum e Marshall (1989) tenham relatado o aumento da secreção dos hormônios do estresse em “ataques de pânico” produzidos pela administração de fenfluramina em pacientes de pânico, Hollander *et al.* (1989c)

argumentam que as “ondas de ansiedade” relatadas pelos pacientes são mais similares ao TAG que aos AP. Como os pacientes de pânico queixam-se freqüentemente de ansiedade antecipatória, a ansiedade tem sido um complicador adicional nos estudos clínicos das respostas endócrinas dos AP. De fato, o eixo HHA é ativado por drogas ansiogênicas (beta-carbolina, fenfluramina) e panicogênicas, dentre as quais a ioimbina e a colecistocinina (CCK) foram as mais estudadas (Graeff *et al.*, 2005). Assim, numa revisão sobre este tópico, Graeff e colaboradores (2005) concluíram que o eixo HHA não é ativado nem pelos AP da vida real, nem por aqueles precipitados por lactato e CO₂. Contrariamente, panicógenos não-seletivos que produzem ansiedade antecipatória ativam o eixo HHA. Em particular, vários estudos mostram que a CCK estimula o PVN, o HDM e os corticotrófos diretamente (Kamilaris *et al.*, 1992; Kobelt *et al.*, 2006). Além disso, enquanto que a administração crônica de pânico líticos clinicamente eficaz, citalopramo, diminui a intensidade dos AP induzidos por CCK, não foi observado atenuação das respostas do eixo HHA (Shlik *et al.*, 1997). Adicionalmente, AP induzido por CCK foi bloqueado por antagonista 5HT-3 odasetron (Depot *et al.*, 1999), vagotomy (Kamilaris *et al.*, 1992) e antagonistas CCK-A (Chen *et al.*, 1993; Kamilaris *et al.*, 1992), sugerindo a mediação de componentes periféricos.

Por outro lado, estudos de Wiedemann e colaboradores (2000) mostraram que a liberação de ACTH e CORT pela CCK é atenuada pela infusão de FNA, tanto nos pacientes de pânico como em voluntários saudáveis. O FNA está envolvido na regulação do eixo HHA, inibindo-o em todos os níveis. Adicionalmente, estudos *in vitro* mostraram que a concentração de FNA na eminência mediana é o dobro da encontrada na periferia, sugerindo sua ação

como um neurohomônio inibidor dos corticotrófos (Lim *et al.*, 1990). Por outro lado, Kellner e colaboradores (1998) mostraram que as infusões de lactato de sódio produzem aumentos significativos do FNA nos pacientes de pânico em relação aos indivíduos sadios. Adicionalmente, nem a solução de NaCl 0,9%, nem a de 2,5%, que é isosmótica ao lactato de sódio 0,5 M, produziram aumentos do FNA dos pacientes ou controles. Estes autores propuseram que a liberação central de FNA é um fator intrínseco à hiporresponsividade do eixo HHA dos pacientes de pânico.

Em todo caso, a ausência de respostas do eixo HHA parece ser um critério necessário dos modelos translacionais de AP. Neste sentido, estudos anteriores de nosso laboratório mostraram que os 'hormônios do estresse' ACTH, CORT e PRL não são alterados nem na resposta de congelamento, nem nas respostas vigorosas, emocionais e de esforço físico, do comportamento de fuga produzido pela estimulação elétrica da MCPD (Silva, 2003; Schenberg *et al.*, 2008). Embora estes resultados sejam indícios convincentes do envolvimento desta estrutura na mediação dos AP, verificamos que os ratos controles apresentavam níveis basais matinais de CORT de 285 ± 76 ng/ml (Silva, 2003). Estes valores são muito superiores aos esperados em ratos intactos (40 a 100 ng/ml) e podem ter sido devidos à recuperação cirúrgica de 5 dias e à implantação das cânulas intra-atriais sob anestesia por éter na véspera da estimulação intracraniana. Portanto, embora os níveis basais de CORT não expliquem a ausência da resposta de PRL, a ausência das respostas de ACTH e CORT à estimulação da MCPD pode ter sido devida à hiperfunção basal do eixo HHA. De fato, Lim e colaboradores (2011) relataram que 30 dias após a implantação dos eletrodos na MCPD,

ratos controles apresentaram concentrações plasmáticas de CORT de apenas 70 ng/ml 30 minutos após a estimulação fictícia. Em contraste, os ratos cuja estimulação produziu respostas de fuga apresentaram concentrações de CORT de 200 ng/ml. Contudo, as respostas de CORT do último experimento podem ter sido devidas ao exercício muscular, e não aos efeitos emocionais da estimulação da MCPD. Em realidade, Schenberg e colaboradores (2008) já haviam observado que a estimulação intermitente (30 s *on* x 30 s *off*) da MCPD por 5 min, com intensidades limiares de fuga, produziu uma elevação de 80% nos níveis plasmáticos de ACTH. Assim, embora o desejo de fuga seja um dos sintomas cardinais dos AP (Klein, 1993; Goetz *et al.*, 1994), a separação dos efeitos emocionais e do exercício físico da resposta de fuga à estimulação da MCPD é fundamental uma vez que a fuga raramente ocorre nos pacientes. Portanto, os resultados contraditórios dos estudos neuroendócrinos de estimulação da MCPD somente poderão ser resolvidos com um método que separe as respostas endócrinas da emoção daqueles do exercício físico em ratos com níveis basais adequados de CORT, que é o objetivo dos estudos que se seguem.

OBJETIVOS

1-OBJETIVO GERAL

Verificar se a estimulação da MCPD não altera os níveis plasmáticos de ACTH, CORT e PRL, tal como ocorre nos AP em humanos, em ratos com níveis basais normais de corticosterona.

2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a influência das rotinas do nosso laboratório relativas à manutenção dos animais, cirurgia, manuseio e métodos de coleta de sangue, no funcionamento basal do eixo HHA.
2. Verificar os efeitos neuroendócrinos e metabólicos da estimulação elétrica da MCPD nas intensidades limiares das respostas de galope e imobilidade numa arena cilíndrica grande (60 cm de diâmetro e altura).
3. Verificar os efeitos neuroendócrinos e metabólicos da estimulação elétrica da MCPD com a intensidade limiar de galope determinada numa arena grande, em ratos estimulados numa arena pequena (20 cm de diâmetro e 25 cm de altura) na qual as respostas de fuga (galope e trote) e o esforço muscular associado são suprimidos, ou fortemente atenuados.

ESTUDO I:

**EFEITOS ESTRESSANTES DO MANUSEIO DIÁRIO E
EXPOSIÇÃO REPETIDA AO AMBIENTE: FIM DE UM
MITO?**

RESUMO: Estudos anteriores mostraram que ratos implantados com eletrodos intracranianos e cânulas intra-atriais apresentavam níveis matinais normais de corticotrofina (ACTH), mas elevados de corticosterona (CORT) (cerca de 300 ng/ml). Portanto, este estudo examinou o efeito de rotinas laboratoriais nas concentrações de ACTH (quimioluminescência) e CORT (radioimunoensaio) do plasma de rato obtido por decapitação sob anestesia de isoflurano. Os resultados mostraram que ratos criados em grupos (4 por caixa) num biotério com luz, temperatura e ruído controlados, apresentam níveis bastante reduzidos de ACTH (94 ± 18 pg/ml) e CORT (57 ± 25 ng/ml). Valores similares foram observados em ratos isolados por 3 ou 6 dias. Contudo, a secreção dos hormônios foi aumentada 5 dias após a implantação de eletrodos intracranianos (CORT: 202 ± 102 ng/ml; ACTH: 257 ± 121 pg/ml), normalizando-se 28 dias após, tanto em ratos isolados (CORT: 93 ± 14 ng/ml; ACTH: 91 ± 5 pg/ml) como agrupados (CORT: 161 ± 31 ng/ml; ACTH: 138 ± 19 pg/ml). Estes hormônios também foram aumentados no dia seguinte à implantação das cânulas intra-atriais (CORT: 249 ± 55 ng/ml; ACTH: 226 ± 33 pg/ml), declinando ligeiramente 3 dias após (CORT: 218 ± 40 ng/ml; ACTH: 157 ± 23 pg/ml). O lactato também foi reduzido pela implantação de cânulas ou eletrodos. Notavelmente, embora os hormônios não tenham sido alterados nem pela conexão ao cabo de estimulação, nem pela exposição isolada à arena, exposições diárias à arena por 10 min ao longo de 10 dias causaram aumentos significativos do ACTH (309 ± 32 pg/ml) e CORT (353 ± 26 ng/ml). Estes resultados prescrevem períodos longos de recuperação cirúrgica e sugerem que a “habituação” seja ineficaz na redução do estresse de captura e exposição ao ambiente novo. **PALAVRAS-CHAVES:** Corticotrofina, Corticosterona, Estresse, Habituação, Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal.

INTRODUÇÃO

O conceito de ‘estresse’ foi cunhado por Hans Selye (1936) para descrever a resposta do organismo a uma demanda intensa, tanto interna quanto externa, física ou psicológica. Embora o termo tenha sido utilizado numa variedade enorme de condições, abrangendo desde jogos eletrônicos e problemas aritméticos até traumas físicos e perda social, Selye (1936) definiu o estresse como uma síndrome produzida por causas inespecíficas cujas principais características eram a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), ulceração gástrica e involução timo-linfática, e cuja permanência resultaria nas “doenças de adaptação” (doenças autoimunes, alergias, hipertensão, etc). Portanto, a despeito das elaborações posteriores de Selye (1976) sobre os tipos saudáveis (*eustress*) ou nocivos (*distress*) de estresse, a definição predominante considera que o estresse deve implicar tanto na ativação do eixo HHA quanto em efeitos nocivos à saúde. O último aspecto está associado aos conceitos mais recentes de “alostase” e “carga alostática”, criados para denotar o reajuste dos mecanismos homeostáticos no curso das “doenças de adaptação” e a demanda excessiva imposta pelo estresse ao organismo, respectivamente (McEwen, 2002, 2007; McEwen e Wingfield, 2002).

Embora a “teoria da inespecificidade” já houvesse sido criticada há muitas décadas por Cannon (ver Selye, 1956) e Mason (1971), ela somente foi testada experimentalmente ao final do século passado, por Pacak e colaboradores (1998). Estes autores mostraram que estressores diferentes (hemorragia, insulina, injeções subcutâneas de formaldeído, frio, ou imobilização) produzem padrões distintos de respostas endócrinas e simpáticas. Adicionalmente, variações percentuais idênticas na intensidade destes estressores resultaram em respostas de magnitudes diferentes.

Conseqüentemente, Pacak e colaboradores (1998) sugeriram que cada estressor tenha uma “assinatura” neuroendócrina, refutando a teoria da inespecificidade.

No curso de estudos preliminares sobre a neuroendocrinologia de ataques de pânico em animais, observamos que ratos com eletrodos intracranianos e cânulas intra-atriais apresentavam níveis matinais basais de normais corticotrofina (ACTH), mas elevados de corticosterona (CORT), em torno de 300 ng/ml (Silva, 2003), bastante superiores aos esperados em ratos intactos, que situam-se entre 40 ng/ml e 100 ng/ml (Atkinson et al., 2008; Takahashi et al., 1991). Como a hiperfunção do eixo HHA resulta em mecanismos adaptativos que limitam as respostas aos estímulos endógenos ou ambientais, os níveis basais elevados de CORT podem ter interferido nos resultados de estudos posteriores com estimulação intracraniana (Schenberg et al., 2008).

Não obstante, não encontramos nenhum estudo sistemático sobre o efeito das rotinas mais comuns dos laboratórios (neurocirurgias, implantação de cânulas, manipulação de animais não anestesiados, etc) sobre a secreção basal de corticotrofina (ACTH) e corticosterona (CORT). Assim, este estudo avaliou os efeitos neuroendócrinos de rotinas amplamente disseminadas mediante procedimentos de quimioluminescência (ACTH) e radioimunoensaio (CORT). Os níveis plasmáticos de glicose (GLI), lactato (LAC) e triglicérides (TRI) também foram examinados. Em particular, verificamos os efeitos da manutenção dos ratos em grupo ou isolados, do isolamento breve por 3 ou 6 dias, da implantação de eletrodos intracranianos e cânulas intra-atriais, do manuseio para conexão de um cabo de estimulação e exposição a um

ambiente novo, e da “habituação” ao estresse pela exposição repetida dos animais a um ambiente novo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais - Ratas grávidas provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo foram transferidas para o biotério “estresse-zero” do Laboratório de Neurobiologia dos Transtornos do Humor e da Ansiedade. Este biotério tinha trânsito limitado de usuários e condições controladas de iluminação (luzes acesas entre 6:00 h e 18:00 h), temperatura (23-25°C) e ruído (basicamente, 46 dB provenientes dos sistemas de condicionamento e renovação do ar). As ratas foram alocadas em caixas de polipropileno (60 cm x 50 cm x 22 cm) com maravalha no assoalho e livre acesso à água e comida. Um dia após o parto, a prole foi padronizada para, no máximo, 8 filhotes machos por ninhada, sacrificando-se as fêmeas. Na idade adulta, os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno em grupos de até 4 animais por caixa, com livre acesso à água e comida. Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais da UFES (CEUA 099/2011).

Coleta de Sangue – As amostras de sangue eram coletadas ao final dos experimentos, entre 8:00 h e 10:00 h da manhã. Para isto, os ratos eram confinados numa campânula de plástico transparente com 33 cm de diâmetro e 13 cm de altura. A campânula era conectada a um frasco (com 12 cm de altura e 8 cm de diâmetro) com 30 ml de isoflurano, e este a uma bomba nebulizadora cujo acionamento administrava o anestésico por fluxo de superfície (100 ml/s) à taxa de 5 ml/min, produzindo uma mistura ar/isoflurano de 0,08%. Os ratos apresentavam perda completa da postura após 2 ou 3 minutos e eram decapitados com o auxílio de uma guilhotina (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). O sangue era coletado em tubos com 0,5 ml de EDTA (1:50.000) e centrifugado por 10 min, a 2000 rpm e 4°C (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Germany). Após o registro do volume final de plasma de cada amostra para

correção do volume adicionado de EDTA, o plasma era armazenado a -80°C até ser transportado, em gelo seco, para o setor de validação dos laboratórios da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP/CRDB, São Paulo, Brasil), para ser analisado quanto às concentrações de ACTH, CORT, prolactina (PRL), glicose (GLI), triglicérides (TRI) e lactato (LAC), por técnicos completamente desconhecedores dos grupos experimentais. Contudo, como os ensaios de PRL ainda não foram concluídos, apenas parte destes resultados foi mostrada neste estudo.

Implantação de Eletrodos – Ratos machos adultos (250-300 g) foram implantados com eletrodos confeccionados com um fio de aço inoxidável de 250 µm de diâmetro (Califórnia Fine Wire Company, Grover City, CA, EUA), isolado em toda extensão, exceto na seção transversal de sua extremidade. Um fio de aço inoxidável não isolado servia de eletrodo indiferente. Os eletrodos eram soldados a um soquete de circuito integrado (Celis, BCPT 50, São Paulo, SP, Brasil). Para a cirurgia, os ratos eram anestesiados com quetamina (0,1 ml/ 100 g de rato, I.P.) e xilazina (0,05 ml/100 g de rato, I.P.), tratados com ceftriaxona sódica (30 mg/kg, I.M.) e diclofenaco sódico (1 mg/kg, I.M.), fixados ao aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA) e cobertos com uma manta para evitar a perda de calor. Em seguida, fazia-se a assepsia da parte superior da cabeça com álcool 70° e solução de iodo e removia-se uma pequena área da pele e tecidos subcutâneos, expondo-se a calvária desde o bregma até o lâmbda. A tricotomia foi evitada pois o pêlo reduz as lesões da pele ao redor do campo cirúrgico, possivelmente, produzidas pela autolimpeza. Após a incisão e raspagem da gálea aponeurótica, eram feitos 4

orifícios (2 nos ossos parietais e 2 no osso interparietal), com o auxílio de uma broca odontológica, para a fixação de pequenos parafusos de aço inoxidável e ancoragem da prótese. A seguir realizava-se um orifício -2,1 mm lateralmente e -7,8 mm posteriormente ao bregma para introdução do eletrodo, num ângulo de 15°, até a profundidade de 5 mm abaixo da superfície óssea. Estas coordenadas correspondem àquelas da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD). Após a soldagem do eletrodo indiferente a um parafuso de fixação e a limpeza e secagem da calota craniana, o campo cirúrgico era preenchido com resina acrílica autopolimerizável de secagem rápida e os ratos eram colocados numa placa térmica (32°C) até se recuperarem da anestesia.

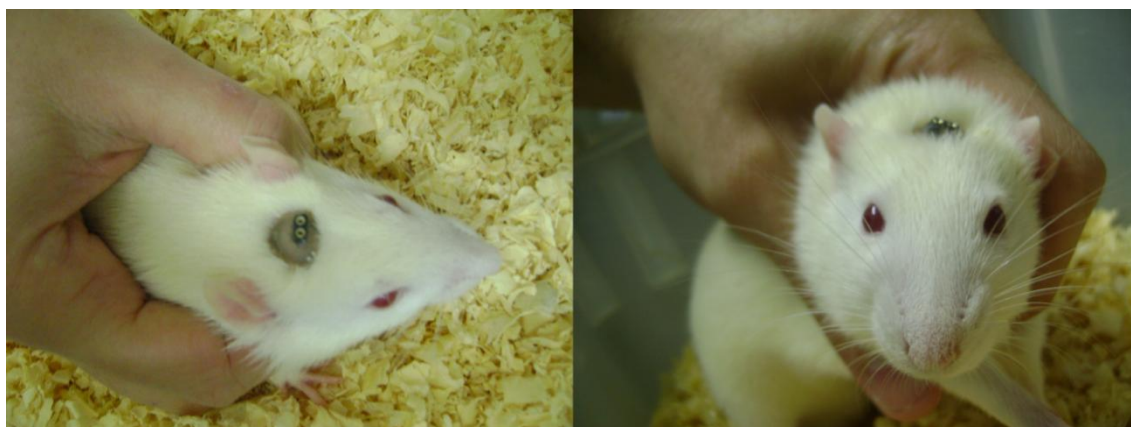


Figura 1 - Ratos 15 dias após a cirurgia de implantação dos eletrodos intracranianos.

Implantação de Cânulas Intra-atriais – Os ratos anestesiados com quetamina (0,1 ml/100 g, I.P.) e xilazina (0,05 ml/100 g, I.P.) eram administrados com ceftriaxona sódica (30mg/kg I.M) e diclofenaco sódico (1mg/kg I.M) e colocados em posição supina numa mesa cirúrgica com os membros fixados. Em seguida, realizava-se a tricotomia da área ventral direita do pescoço e era feita uma incisão de aproximadamente 1,5 cm para acessar a veia jugular externa. Após

a dissecação e isolamento do vaso, realizava-se um pequeno orifício na veia para introdução de um cateter de silastic (1 mm de diâmetro) preenchido com solução salina e heparina (5.000 UI/0,25 ml, Cristália, São Paulo, SP). O cateter era conduzido até o átrio direito e fixado com uma linha de algodão. A seguir, a extremidade livre do cateter era conduzida por meio de um trocáter sob a pele da região dorsal e exposta ao nível da nuca. Após a sutura das incisões, os animais eram mantidos numa placa aquecida a 32°C até se recuperarem da anestesia.

Ensaio Bioquímicos – Os níveis plasmáticos de ACTH foram medidos em duplicata por imunoensaio enzimático de quimioluminescência (Immulin 2000[®], Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, EUA) com sensibilidade de 5 pg/ml e coeficientes de variação (C.V.) intra-ensaio (*single run*) e entre-ensaios (*different runs*) de 7,7±0,6% e 8,4±0,7%, respectivamente (média±EPM de 5 amostras). A CORT foi medida por radioimunoensaio de anticorpo duplo específico para ratos e camundongos (ImmuChem[®], MP Biomedicals, Orangeburg, NY, EUA). O ensaio tem sensibilidade de 7,7 ng/ml e C.V. intra- e entre-ensaios de 7,2±1,7% e 17,4±7,9%, respectivamente (média±EPM de 3 amostras). A dosagens de GLI foi realizada por meio de colorimétrico-enzimático (Advia, Siemens) e C.V intra-ensaio e entre-ensaios de 1,3% e 3,3%, respectivamente. O LAC foi analisado por química seca (Vitrus-5600, Johnson&Johnson). E os níveis de TRI foram realizadas por colorimétrico-peroxidase (Advia 2400, Siemens) com C.V intra-ensaio (Controle Baixo: 1,6% Controle Alto: 0,5%) e entre-ensaios de Controle Baixo: 2,4% Controle Alto:

0,9%. Os ensaios foram realizados por técnicos totalmente desconhecedores dos experimentos realizados.

Protocolos experimentais

Experimento 1: Controles intactos (CTRL-BIO). Ratos ($n=9$) nascidos e criados no biotério estresse-zero do Laboratório de Neurobiologia eram suspensos pelo abdome e transferidos a uma arena cilíndrica de acrílico transparente, com 60 cm de diâmetro e altura, situada numa sala com atenuação sonora, iluminação de 230 lux e temperatura entre 23 e 25°C. Imediatamente após, os ratos eram confinados na campânula de anestesia, anestesiados com mistura ar/isoflurano e decapitados para coleta de sangue.

Experimento 2: Ratos submetidos ao procedimento de habituação (HAB). Diariamente, ratos machos adultos ($n=15$) eram suspensos pelo abdome e transferidos para a arena, onde permaneciam sem serem perturbados por 10 min, entre 8h e 10h da manhã, antes de retornarem à caixa-ninho. O procedimento era repetido por 10 dias consecutivos, sacrificando-se os animais ao final da última sessão.

Experimento 3: Ratos submetidos ao isolamento social durante 3 dias (ISO-3D) e 6 dias (ISO-6D). Ratos adultos foram submetidos ao isolamento social por 3 dias ($n=5$, ISO-3D) ou 6 dias ($n=5$, ISO-6D). Estes ratos ficaram acomodados individualmente em caixas individuais de polipropileno (30 x 20 x 19 cm) com maravalha no assoalho e livre acesso à água e comida.

Experimento 4: Ratos implantados com cânulas intra-atriais e recuperação cirúrgica de 1 dia (CAN-1D) ou 3 dias (CAN-3D). Ratos implantados com

cânulas intra-atriais e mantidos em condições similares foram subdivididos de acordo com o período de recuperação cirúrgica de 1 dia (CAN-1D, $n=13$) ou 3 dias (CAN-3D, $n=11$). Ao final deste período, os animais eram transferidos à arena e, imediatamente, anestesiados e decapitados para coleta de sangue.

Experimento 5: Ratos implantados com eletrodos intracranianos com recuperações cirúrgicas de 5 e 28 dias em grupos de 4 animais (POS-5Dgr e POS-28Dgr) ou de 28 dias em isolamento (POS-28Dis). Ratos implantados com eletrodos eram subdivididos em 3 grupos: 1) recuperação cirúrgica em grupo numa caixa de polipropileno (60 x 50 x 22 cm) pelo período de 5 dias ($n=4$, POS-5D gr), 2) recuperação cirúrgica em grupos de 4 animais em caixas de polipropileno (60 x 50 x 22 cm), por um período de 28 dias ($n=$, POS-28D gr), 2) recuperação cirúrgica em isolamento em caixas com paredes de vidro (28 x 17 x 30 cm), por um período de 28 dias ($n=$, POS-28D gv). Ao final da recuperação cirúrgica, os ratos transferidos à arena, anestesiados e decapitados para coleta sanguínea.

Análise Estatística - As concentrações plasmáticas dos hormônios foram corrigidas para o volume adicionado de EDTA (0,5 ml). Dois ratos com níveis extremos (*outliers*) de CORT e PRL foram excluídos por meio do teste de resíduo normal máximo ao nível de $P<0,05$ (Snedecor e Cochran, 1982). Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de testes-t para amostras independentes. As diferenças foram consideradas significantes para o nível de 5% de Bonferroni.

RESULTADOS

Experimento 1: Efeitos da habituação e do isolamento social por 3 e 6 dias nos níveis plasmáticos matinais de ACTH, CORT, GLI, TRI e LAC:. Ratos criados na ausência de estresse apresentaram valores bastante reduzidos de CORT (57 ± 25 ng/ml) e ACTH (94 ± 18 pg/ml) (Fig.2, Tabela 1). A análise de variância (ANOVA) mostrou que os grupos diferiram significativamente quanto às concentrações plasmáticas de CORT ($F_{3,30}=26,35$; $P<0,0001$) e ACTH ($F_{3,30}=11,72$; $P<0,0001$). Em contraste, não foram observadas diferenças significantes para GLI, LAC e TRI (Fig.3, Tabela 1).

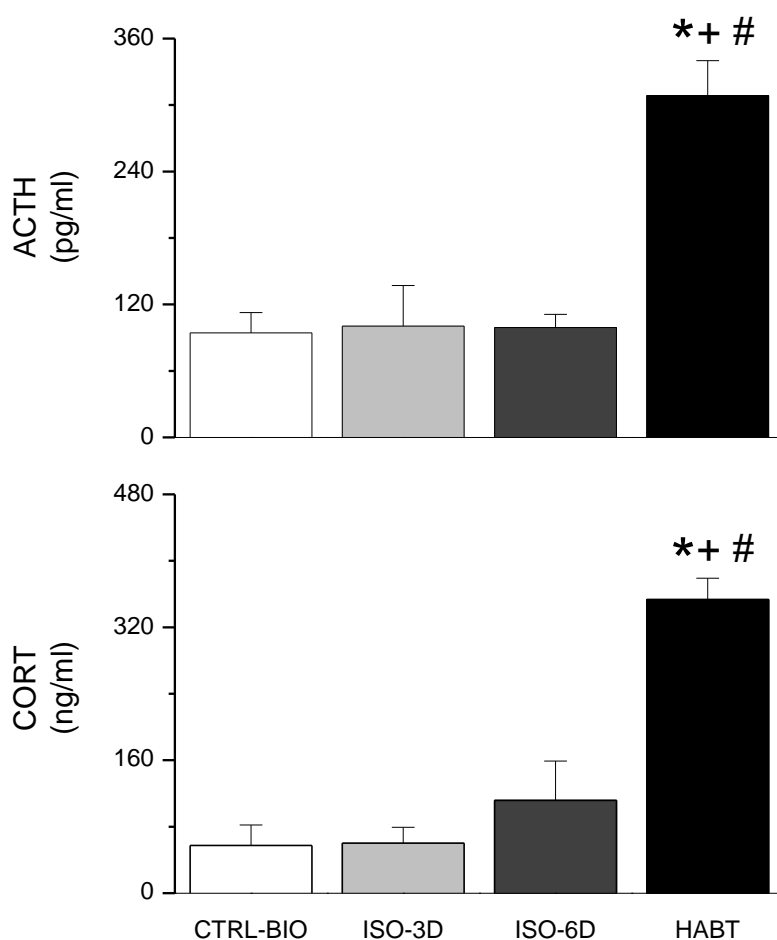


Figura 2 – Níveis plasmáticos de corticotrofina (ACTH) e corticosterona (CORT) em controles (CTRL-BIO) e ratos submetidos à habituação (HAB) ou ao isolamento social de 3 (ISO-3D) ou 6 dias (ISO-6D). Os símbolos indicam diferenças significantes em relação aos grupos CTR (*), ISO-3D (+) e ISO-6D (#) (critério de 5% de Bonferroni).

As diferenças entre grupos foram devidas aos níveis hormonais significativamente maiores dos ratos submetidos ao procedimento de habituação, tanto em relação aos controles (ACTH: $P<0,0001$; CORT: $P<0,0001$) quanto aos ratos isolados por períodos de 3 (ACTH: $P<0,0005$; CORT: $P<0,0001$) ou 6 dias (ACTH: $P<0,0005$; CORT: $P<0,0001$). Em contraste, não foram observadas diferenças significativas entre controles e ratos submetidos ao isolamento social breve.

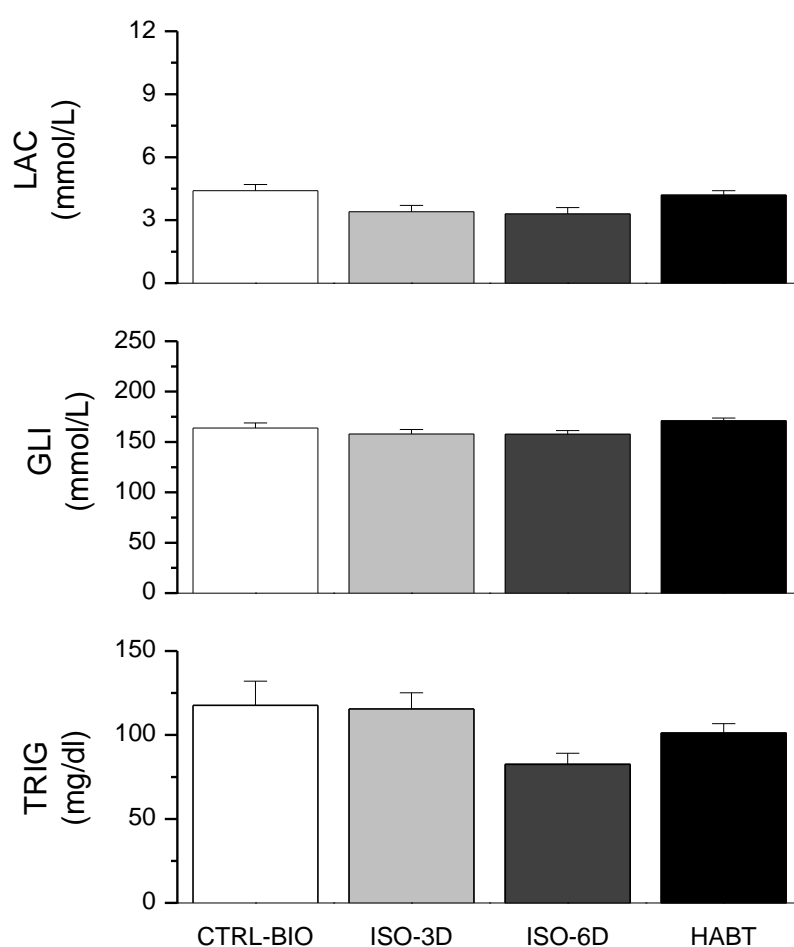


Figura 3 – Níveis plasmáticos de lactato (LAC), glicose (GLI) e triglicérides (TRI) em controles (CTRL-BIO) e ratos submetidos à habituação (HAB) ou ao isolamento social de 3 (ISO-3D) ou 6 dias (ISO-6D).

Tabela 1. Níveis plasmáticos de corticotrofina (ACTH), corticosterona (CORT), glicose (GLI), lactato (LAC) e triglicérides em controles (CTRL-BIO) e ratos submetidos à habituação (HAB) ou ao isolamento social de 3 dias (ISO-3D) ou 6 dias (ISO-6D). Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos CTR (*), ISO-3D (+) e ISO-6D (#), respectivamente (critério de 5% de Bonferroni).

	CTR-BIO (n=9)	ISO-3D (n=5)	ISO-6D (n=5)	HAB (n=15)
ACTH (pg/mL)	94,4 ± 18,3	100,5 ± 36,6	99,2 ± 12,0	308,5 ± 35,5 ^{*+ #}
CORT (ng/mL)	57,4 ± 24,7	67,6 ± 21,7	126,1 ± 53,1	353,4 ± 25,6 ^{*+ #}
GLI (mmol/L)	163,8 ± 5,0	158,0 ± 4,5	157,7 ± 3,9	171,0 ± 3,2
LAC (mmol/L)	4,4 ± 0,3	3,3 ± 0,3	3,4 ± 0,3	4,2 ± 0,2
TRI (mg/dL)	117,7 ± 14,3	115,5 ± 9,7	82,5 ± 6,6	101,1 ± 6,4

Experimento 2 :Efeitos da implantação de cânulas intra-atriais com períodos de recuperação cirúrgica de 1 e 3 dias nos níveis plasmáticos matinais de ACTH, CORT, GLI, TRI e LAC: A implantação de cânulas intra-atriais teve efeitos significantes nas concentrações plasmáticas de CORT ($F_{2,30} = 4,6$; $P < 0,02$), ACTH ($F_{2,30} = 5,7$; $P < 0,05$), GLI ($F_{2,30} = 26,6$; $P < 0,0001$) e LAC ($F_{2,30} = 17,9$; $P < 0,0001$). Em contraste, não houve alteração nos níveis de TRIG (Figs. 4-5, Tabela 2).

As diferenças hormonais foram basicamente devidas aos valores plasmáticos mais elevados do grupo CAN-1D (ACTH: $P < 0,005$; CORT: $P < 0,01$) em relação aos controles. Contudo, os níveis de CORT também foram marginalmente aumentados no grupo CAN-3D ($P < 0,03$) (Fig.4, Tabela 2).

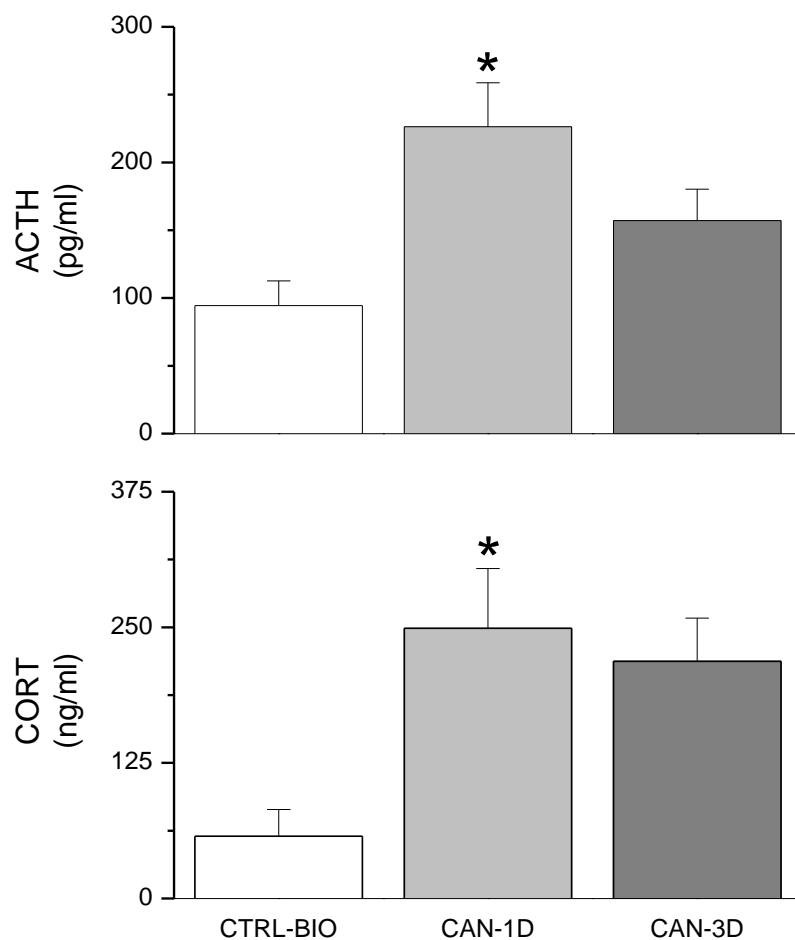


Figura 4 – Níveis plasmáticos de corticotrofina (ACTH) e corticosterona (CORT) em controles (CTRL-BIO) e ratos submetidos à canulação intra-atrial seguida de períodos de recuperação cirúrgica de 1 (CAN-1D) ou 3 dias (CAN-3D). *, estatisticamente diferente do grupo CTRL-BIO (critério de 5% de Bonferroni).

Os níveis plasmáticos de GLI do grupo CAN-3D foram estatisticamente inferiores àqueles dos controles ($P < 0,0001$) e do grupo CAN-1D ($P < 0,0001$) (Fig. 5, Tabela 2). Comparados aos ratos controles, os níveis de LAC também foram significativamente reduzidos nos grupos CAN-1D ($P < 0,0001$) e CAN-3D ($P < 0,0001$).

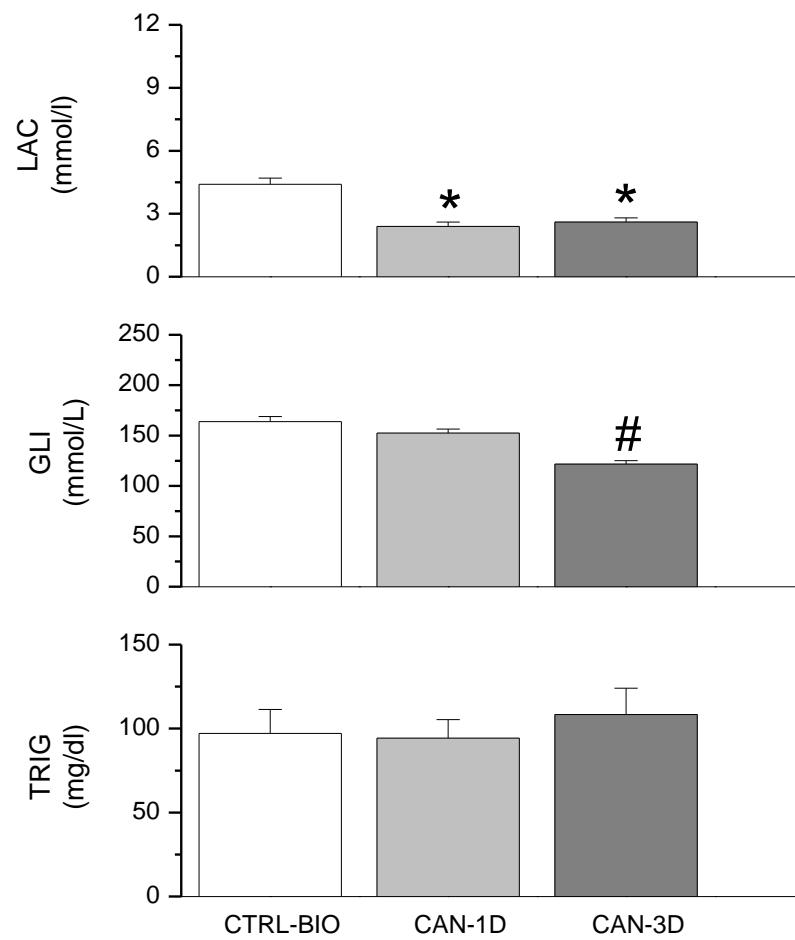


Figura 5 – Níveis plasmáticos de glicose (GLI), lactato (LAC) e triglicérides (TRI) em ratos controles (CTRL-BIO) e ratos submetidos à canulação intra-atrial seguida de períodos de recuperação cirúrgica de 1 (CAN-1D) ou 3 dias (CAN-3D). Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significantes dos grupos CTRL-BIO (*) e CAN-1D (#) (critério de 5% de Bonferroni).

Tabela 2. Níveis plasmáticos de corticotrofina (ACTH), corticosterona (CORT), glicose (GLI), lactato (LAC) e triglicérides em controles (CTRL-BIO) e ratos submetidos à e ratos submetidos à canulação intra-atrial e períodos de recuperação cirúrgica de 1 (CAN-1D) ou 3 dias (CAN-3D). Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos CTR (*), CAN-1D (*) e CAN-3D (#), respectivamente (critério de 5% de Bonferroni).

	CTR-BIO (n=9)	CAN-1D (n=13)	CAN-3D (n=11)
ACTH (pg/mL)	94,4 ± 18,3	226,3 ± 32,47*	157,1 ± 23,2
CORT (ng/mL)	57,4 ± 24,7	249,1 ± 55,1*	218,3 ± 39,7
GLI (mmol/L)	163,8 ± 5,0	152,5 ± 4,0	121,7 ± 3,4*#
LAC (mmol/L)	4,4 ± 0,3	2,4 ± 0,2*	2,6 ± 0,2*
TRI (mg/dL)	117,7 ± 14,3	94,4 ± 11,0	108,5 ± 15,6

Experimento3: Efeitos da implantação de eletrodos intracranianos nos níveis plasmáticos de ACTH, CORT, GLI, LAC e TRI de ratos com recuperação cirúrgica em grupo, numa caixa de polipropileno, por períodos de 5 (5D-GR) e 28 dias (28D-GR), ou em isolamento, numa caixas de vidro, por 28 dias (28D-IS). A comparação dos grupos por ANOVA somente detectou diferenças significantes para o ACTH ($F_{3,28} = 2,8$; $P < 0,05$) e LAC ($F_{3,28} = 9,24$; $P < 0,0005$) (Figs.6-7, Tabela 3). A comparação dos pares por testes de Bonferroni mostrou que as concentrações plasmáticas de ACTH do grupo 5D-GR foram significativamente mais elevadas que aquelas dos ratos controles ($P < 0,01$). Os níveis de ACTH dos ratos que tiveram recuperação cirúrgica de 5 dias também foram marginalmente aumentados em relação a ambos os grupos com 28 dias de recuperação cirúrgica. Contudo, estas comparações não atingiram o critério

de Bonferroni, provavelmente, devido à pequena amostra ($n= 4$) e alta variabilidade (CV= 94%) dos dados do grupo 5D-GR (Fig 6, Tabela 3).

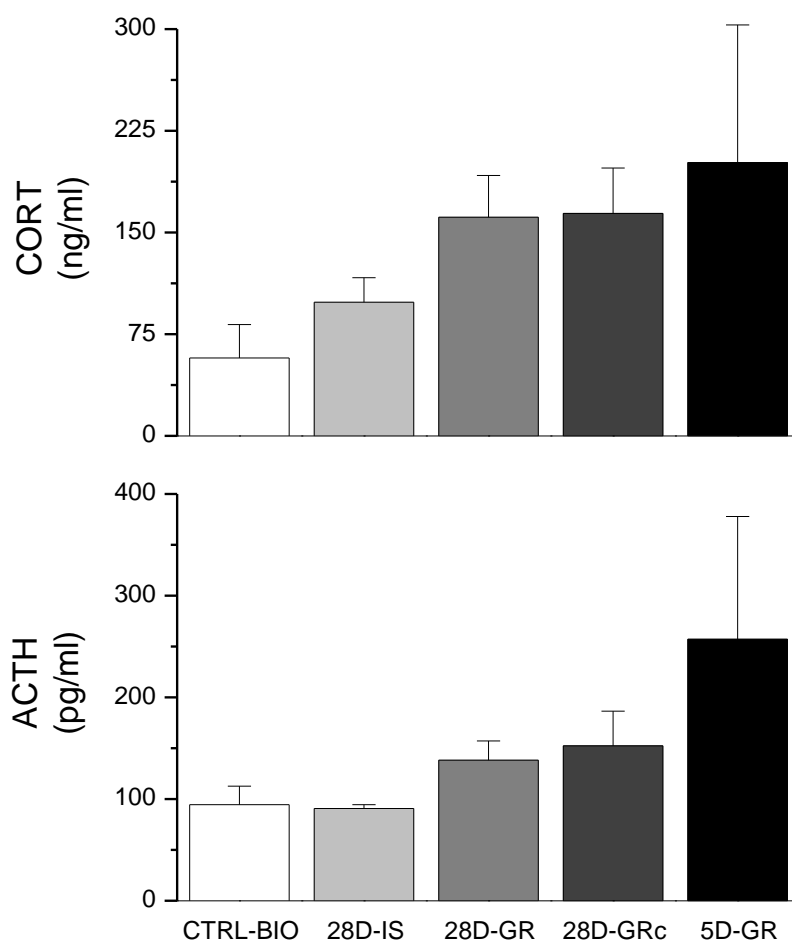


Figura 6 – Níveis plasmáticos de corticosterona (CORT) e corticotrofina (ACTH) de ratos controles (CTRL-BIO), com recuperação cirúrgica numa caixas de vidro, por 28 dias em isolamento (28D-IS), em grupo, numa caixa de polipropileno, por períodos de 28 dias (28D-GR), com período de 28 dias e colocação de cabo de estimulação intracraniana (28D-GRc) e com período de 5 dias (5D-GR) .

Ratos que desfrutaram de 28 dias de recuperação cirúrgica, em grupo ou isolados, apresentaram reduções significativas dos níveis de LAC tanto em relação aos controles intactos (28D-GR: $P<0,0005$; 28D-IS: $P<0,005$, respectivamente) quanto aos ratos com 5 dias de recuperação cirúrgica ($P<0,005$ para agrupados ou isolados) (Fig.7, Tabela 3).

Tabela 3. Níveis plasmáticos de corticotrofina (ACTH), corticosterona (CORT), glicose (GLI), lactato (LAC) e triglicérides em controles virgens (CTRL-BIO) e ratos implantados com eletrodos intracranianos após recuperação cirúrgica em grupo em caixas de polipropileno ($n=4$ /caixa) por 5 dias (5D-GR), 28 dias (28D-GR) ou 28 dias após conexão ao cabo de estimulação (28D-GRc), ou em isolamento em caixas de vidro por 28 dias (28D-IS). Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos CTR (*), 5D-GR (*), respectivamente (critério de 5% de Bonferroni).

	CTR-BIO ($n=9$)	5D-GR ($n=4$)	28D-GR ($n=15$)	28D-GRc ($n=15$)	28D-IS ($n=5$)
ACTH (pg/mL)	94,4±18,3	257,8±121*	138,2±18,9	152,3±34,2	90,7 ±3,8
CORT (ng/mL)	57,4±24,7	202±102	161,3±30,7	164±33,5	98,6 ±18,2
GLI (mmol/L)	163,8±5,0	148,3±10,3	169,5±4,9	162,9±4,5	171 ±2,7
LAC (mmol/L)	4,4±0,3	4,5±0,2	3,2±0,1* ⁺	3,6±0,2	3,2 ±0,1* ⁺
TRI (mg/dL)	117,7±14,3	122,7±17,6	126,8±8,1	77,9±13,9	103 ±14,8

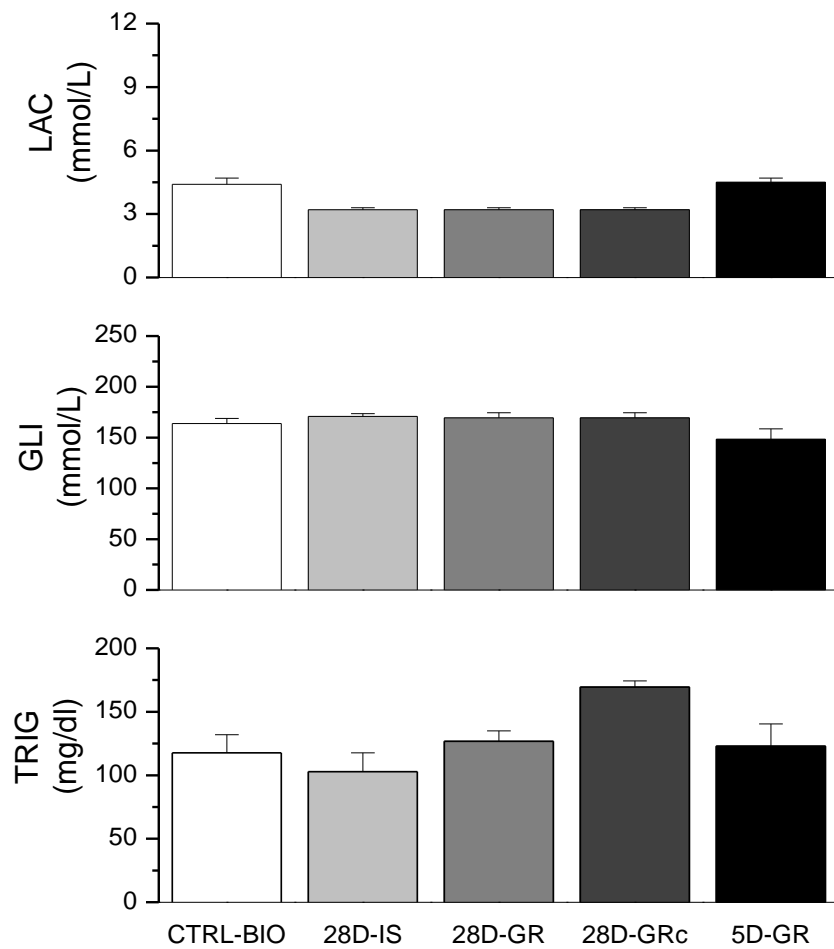


Figura 7 – Níveis plasmáticos de glicose (GLI), lactato (LAC) e triglicérides (TRI) de ratos controles (CTRL-BIO), e ratos implantados com eletrodos intracranianos após recuperação cirúrgica em grupo em caixas de polipropileno ($n=4$ /caixa) por 5 dias (5D-GR), 28 dias (28D-GR) ou 28 dias após conexão ao cabo de estimulação (28D-GRc), ou em isolamento em caixas de vidro por 28 dias (28D-IS).

DISCUSSÃO

Estudos anteriores mostraram que ratos implantados com eletrodos intracranianos e cânulas intra-atriais apresentavam concentrações plasmáticas matinais elevadas de CORT (cerca de 300 ng/ml) (Silva, 2003; Schenberg *et al.*, 2008). Conseqüentemente, tanto as concentrações aparentemente normais de ACTH quanto a ausência de resposta hormonais à estimulação elétrica aversiva da MCPD podem ter sido devidos à inibição do eixo HHA pelos níveis circulantes elevados de CORT. De fato, estudos recentes de Lim e colaboradores (2011) mostraram que ratos com níveis plasmáticos reduzidos de CORT (70 ng/mL) apresentaram aumentos de aproximadamente 200% nos níveis deste hormônio 30 min após os comportamentos de fuga induzidos pela estimulação elétrica da MCPD. Por outro lado, não há estudos dedicados aos efeitos de rotinas laboratoriais sobre o eixo HHA. Portanto, o presente estudo realizou a análise sistemática do efeito de rotinas comuns a vários laboratórios sobre os níveis de CORT e ACTH e índices metabólicos.

Os resultados mostraram que ratos criados em grupos de, no máximo, 4 animais por caixa, num biotério com luz, temperatura e ruído controlados, apresentam níveis bastante reduzidos de CORT (57 ± 25 ng/ml) e ACTH (94 ± 18 pg/ml). Estes dados indicam a virtual ausência de estresse tanto das condições do biotério (estresse-zero) do laboratório quanto dos métodos de sacrifício e coleta de sangue por decapitação sob anestesia de isoflurano, respectivamente. Valores similares foram observados em ratos isolados por 3 ou 6 dias, afastando a influência de efeitos significativos de períodos breves de isolamento de ratos adultos em caixas pequenas de polipropileno.

Comparados aos ratos controle, os níveis plasmáticos de CORT e ACTH foram significativamente aumentados (Δ CORT= 337%; Δ ACTH= 140%)

um dia após o procedimento cirúrgico aparentemente inócuo de implantação de cânulas intra-atriais pela veia jugular. Embora os níveis de ACTH tenham retornado a valores praticamente normais 3 dias após a implantação das cânulas (Δ ACTH= 67%), a redução da secreção deste hormônio pode ter sido secundária à inibição do eixo HHA pelos níveis cronicamente elevados de CORT (Δ CORT=282%). Como a coleta de sangue por cânulas intra-atriais só é possível por, no máximo, 5 dias, nossos resultados prescrevem o uso criterioso deste procedimento nos estudos que exigem a função normal do eixo HHA. Por outro lado, embora as amostras sangüíneas do presente estudo tenham sido obtidas por decapitação, a coleta do sangue por sucção pode liberar ACTH por estimulação de receptores atriais de volume (Baertschi *et al.*, 1976). Por fim, a coleta do sangue por cânulas intra-atriais é freqüentemente acompanhada da heparinização do animal, o que pode reduzir a sensibilidade de ensaios de quimioluminescência de ACTH em até 25%. Portanto, se os ensaios de ACTH exigem coletas repetidas de amostras em preparações *in vivo*, a obstrução das cânulas deve ser minimizada pelo tratamento com edetato de cálcio e sódio (CaNa₂EDTA, mas não Na₂EDTA ou EDTA, que são tetanizantes).

Os níveis de CORT e ACTH também foram aumentados 5 dias após a implantação dos eletrodos (Δ CORT= 254%; Δ ACTH= 173%). Estes hormônios só retornaram a valores praticamente normais 28 dias após a cirurgia, principalmente, nos ratos isolados em caixas de vidro (Δ CORT= 63%; Δ ACTH= -3%), mas também naqueles agrupados em caixas de polipropileno (Δ CORT= 180%; Δ ACTH= 47%). Contudo, não houve diferenças significantes entre os níveis de CORT, possivelmente, devido ao tamanho reduzido dos grupos ($n=4$) submetidos a recuperações cirúrgicas de 28 dias em isolamento e

5 dias em grupo e, principalmente, à alta variabilidade dos valores de CORT do último grupo (C.V.=101%). Em todo evento, estas observações aconselham períodos longos de recuperação cirúrgica, mesmo quando a cirurgia empregar métodos minimamente agressivos, como foi o caso do presente estudo.

Notavelmente, embora os níveis de CORT e ACTH não tenham sido alterados de forma significativa nos ratos que foram conectados ao cabo de estimulação e expostos uma única vez à arena, estes hormônios foram significativamente aumentados (Δ CORT= 519%; Δ ACTH= 287%) nos ratos que foram manuseados e expostos à arena por 10 min diários, ao longo de 10 dias. Tal como nos experimentos anteriores, os aumentos menores dos níveis de ACTH podem ter sido devidos aos níveis plasmáticos cronicamente elevados de CORT. Em todo caso, estes resultados sugerem que a “habituação” por manuseio e exposição repetida ao ambiente seja um procedimento ineficaz para a redução da resposta neuroendócrina de ratos à captura e exposição a um ambiente estranho. Embora inesperados, estes resultados não são inéditos. De fato, estudos pioneiros mostraram que ao invés de habituação, a resposta de CORT de camundongos desenvolve sensibilização em animais que foram repetidamente capturados (pela cauda) e expostos ao mesmo ambiente (Hennessy e Levine, 1977; Smolensky *et al.*, 1978). Estas observações foram corroboradas em estudos recentes que mostraram que camundongos manuseados diariamente ao longo de 6 dias apresentam níveis mais elevados de CORT que os manuseados uma única vez (Longordo *et al.*, 2011). De forma similar, Benedetti e colaboradores (2012) não observaram habituação da resposta de CORT de camundongos expostos repetidamente ao mesmo ambiente. A ausência de habituação da resposta de CORT a um ambiente novo também foi observada nas condições peculiares do eixo HHA de

camundongos com apenas duas semanas de vida (D'Amato *et al.*, 1992). Embora os estudos sobre a habituação ao manuseio e ambiente sejam mais raros em ratos, Klein e colaboradores (2010) relataram que ratos habituados ao ambiente apresentaram níveis mais elevados de CORT que os não habituados. De forma similar, Lucas e colaboradores (2007) mostraram que ratos manuseados (controles do estresse crônico) apresentam níveis maiores de CORT que ratos virgens. Estes resultados contrastam com a extensa literatura sobre a habituação das respostas do eixo HHA à exposição repetida do mesmo estressor (File *et al.*, 1982; Kant *et al.*, 1985, 1987; De Boer *et al.*, 1990; Lachuer *et al.*, 1994; Melia *et al.*, 1994; Campmany *et al.*, 1996; Marti e Armario, 1998; Thorsell *et al.*, 1999; Cole *et al.*, 2000; Pace *et al.*, 2001; Bhatnagar *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2002; Jaferi e Bhatnagar, 2006, 2007; Storey *et al.*, 2006; Tanke *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2010; Daskalakis *et al.*, 2011; Petrowski *et al.*, 2012). Não obstante, também existem relatos de ausência de habituação à exposição repetida de estressores homotípicos, de intensidade moderada ou severa, em ratos (Clement *et al.*, 1998; Masini *et al.*, 2006; Razzoli *et al.*, 2007), hamsters (Kollack-Walker *et al.*, 1999) e humanos (Wust *et al.*, 2005). As observações conflitantes podem ser devidas a uma multiplicidade de fatores, incluindo tanto a linhagem (Dhabhar *et al.*, 1997; Stohr *et al.*, 1999; Uchida *et al.*, 2008; Salomons *et al.*, 2010), ambiente maternal (Uchida *et al.*, 2010), idade (Doremus-Fitzwater *et al.*, 2009), manutenção dos animais em grupos ou isolados (Lucas *et al.*, 2007) e manuseio por um ou vários experimentadores (Dobrákovova *et al.*, 1993) quanto a severidade (Pitman *et al.*, 1988), previsibilidade (De Boer *et al.*, 1989; Marti e Armário, 1997), periodicidade (De Boer *et al.*, 1990; Ma e Lightman, 1998; Masini *et al.*, 2008) e responsividade individual (Natelson *et al.*, 1988) aos estressores.

Por outro lado, embora não tenhamos observado diferenças estatisticamente significativas entre controles e ratos submetidos ao isolamento social de 3 e 6 dias, os níveis de CORT dos ratos isolados por 6 dias foram moderadamente aumentados ($\Delta\text{CORT}=120\%$). Possivelmente, estes efeitos não alcançaram significância estatística ($P<0,13$) devido ao tamanho reduzido dos grupos isolados ($n=5$). No mesmo sentido, Lucas e colaboradores (2007) mostraram que não há diferença dos níveis basais de CORT de ratos manuseados diariamente e alojados em pares ou individualmente, por um período de 10 dias. Surpreendentemente, no entanto, eles observaram que a habituação ao estresse de imobilização somente se desenvolveu nos ratos alojados em pares, mostrando que o eixo HHA não é indiferente ao isolamento social de ratos adultos.

Os níveis de LAC também foram significativamente reduzidos nos grupos CAN-1D e CAN-3D em relação aos ratos controles. Esta diferença foi provavelmente devido a pouca locomoção dos ratos após cirurgia de implantação da cânula intraatrial mantidos gaiola individual. Também observamos redução dos níveis plasmáticos de GLI do grupo CAN-3D comparados ao grupo CAN-1D. Esta redução, deve-se possivelmente aos níveis de CORT significantemente aumentados somente 1 dia após a cirurgia de implantação de cânula intraatrial.

Portanto, os resultados deste estudo prescrevem períodos longos de recuperação cirúrgica, coleta de sangue por decapitação sob anestesia por anestésicos inalatórios. E por fim, eles também sugerem que os procedimentos comuns de “habituação” nos quais os animais são periodicamente manuseados e expostos a um ambiente não familiar podem gerar respostas inatas ou condicionadas (ansiedade antecipatória) de medo e a ativação concomitante do

eixo HHA. Estas observações não invalidam a utilização do manuseio de ratos controles em estudos cujos procedimentos envolvam graus similares de manipulação dos grupos experimentais.

ESTUDO II:

AUSÊNCIA DE RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS APÓS A
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA AVERSIVA DA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL DO RATO

RESUMO: Os ataques de pânico (AP) em humanos, tanto espontâneos como induzidos por lactato de sódio, não são acompanhados pelo aumento da secreção dos 'hormônios do estresse' de corticotrofina (ACTH), cortisol (CORT) e prolactina (PRL). Estudos anteriores mostraram que estes hormônios também não são alterados após os comportamentos de defesa produzidos por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) de ratos. Contudo, os níveis matinais de CORT destes experimentos situavam-se em torno de 300 ng/ml, valores muito superiores aos esperados (60-100 ng/ml). Embora os valores basais de CORT não expliquem a ausência de resposta da PRL, eles podem ter inibido a resposta de ACTH. De fato, estudos posteriores de outros autores mostraram que ratos com níveis normais de CORT apresentaram aumentos significantes dos níveis deste hormônio 30 min após o comportamento de fuga induzido por estimulação da MCPD. Contudo, a elevação da CORT pode ter sido devida ao esforço muscular da resposta intensa de fuga. Assim, o presente estudo re-examinou as respostas hormonais à estimulação da MCPD em arenas com o diâmetro grande (60 cm) ou pequeno (20 cm), na qual as respostas de trote e galope são suprimidas. Além de corroborar os estudos anteriores com estimulação em arenas grandes, os resultados mostraram que ratos com níveis basais reduzidos de CORT não apresentam nenhuma alteração dos hormônios do estresse 2 ou 30 min após a estimulação na arena pequena com a intensidade limiar de fuga da arena grande. Estes resultados são consistentes com a mediação dos AP pela MCPD.

Palavras-chaves: Ataque de pânico, Matéria Cinzenta Periaquedutal, Estresse, Corticotropina, Corticosterona, Prolactina.

INTRODUÇÃO

Embora a marca fundamental do conceito de estresse de Selye (1936, 1976) seja a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) por uma variedade enorme de estressores, tanto físicos quanto psicológicos, existem evidências abundantes de que os “hormônios do estresse” corticotropina (ACTH), cortisol/corticosterona (CORT) e prolactina (PRL) não são alterados pelo estresse psicológico inquestionável dos ataques de pânico (AP) (Liebowitz *et al.*, 1985 a; Levin *et al.*, 1987; Woods *et al.*, 1987, 1988; Hollander *et al.*, 1989a,b; Kellner *et al.*, 1998). A ausência de ativação dos “hormônios do estresse” nos AP constitui-se, portanto, num dos achados mais desnorteantes da psiquiatria contemporânea (Hollander *et al.*, 1989c, Graeff *et al.*, 2005).

Por outro lado, existem evidências de que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) dos pacientes de pânico esteja hiperativo em condições de repouso. Realmente, pacientes de pânico apresentam respostas aumentadas de ACTH à administração do hormônio de liberação da corticotrofina (CRH) no dia seguinte à supressão periférica do eixo por dexametasona (Schreiber *et al.*, 1996; Erhardt *et al.*, 2006). Estes experimentos sugeriram que a ausência de respostas neuroendócrinas nos AP possa ser devida a processos adaptativos secundários à hiperfunção crônica do eixo HHA. Alternativamente, os ataques recorrentes de pânico poderiam ter desencadeado processos adaptativos similares aos que ocorrem para as respostas neuroendócrinas de humanos e animais à exposição repetida aos estressores (Kirschbaum *et al.*, 1995; Schommer *et al.*, 2003, ver Estudo I).

Por outro lado, como os AP são imprevisíveis, a ausência de resposta neuroendócrina foi freqüentemente demonstrada em AP induzidos por infusão de lactato de sódio ou inalação de dióxido de carbono (CO₂). Apesar das

similaridades destes ataques com as crises clínicas de pânico (Klein, 1993), tem sido questionado se os resultados negativos destes estudos podem ser estendidos aos AP espontâneos da clínica. Não obstante, num dos raros estudos neuroendócrinos de ataques espontâneos, Cameron e colaboradores (1987) não observaram nenhum aumento significativo nos níveis plasmáticos de CORT e PRL, tanto no auge das crises quanto 10 ou 60 min após 9 ataques espontâneos de pânico em pacientes internados. De forma semelhante, não houve alteração destes hormônios após os AP de pacientes não-tratados com agorafobia (Woods *et al.*, 1987). No mesmo sentido, estudos recentes mostraram que os pacientes com TP apresentam resposta atenuada de CORT ao estresse de hipoglicemia (Jezova *et al.*, 2010) e terapia de agorafobia por exposição ao contexto fóbico (Sigmund *et al.*, 2011). Por fim, Anegg e colaboradores (2002) mostraram que enquanto os níveis plasmáticos de PRL permaneceram inalterados, os níveis salivares de CORT diminuíram após AP naturais induzidos por alarmes falsos de esgotamento de oxigênio do equipamento de mergulhadores em treinos de emergência. Em adição, embora a redução do CORT salivar possa ter sido devida à lavagem da boca durante o mergulho, os níveis de PRL dos mergulhadores que não “entraram em pânico” foram muito maiores do que aqueles que apresentaram AP. Este estudo é particularmente importante dada a estreita relação da emergência do mergulho com o risco de sufocamento (Klein, 1993).

De acordo com estes estudos, Petrowski e colaboradores (2010) sugeriram que os pacientes de pânico apresentam uma anormalidade específica na resposta de CORT ao estresse psicossocial. De fato, enquanto a elevação do CORT produzida pelo despertar é normal nos pacientes com TP, a resposta ao estresse psicossocial está atenuada. Petrowski e colaboradores

(2012) mostraram que pacientes que sofreram apenas um ou dois AP também apresentaram a atenuação da resposta de CORT ao estresse psicossocial,. Adicionalmente, pacientes com TP há mais de 2 anos apresentaram respostas mais acentuadas de CORT ao teste DEXA-CRH que os pacientes com TP recente. Estas observações tornam improvável a hipótese de habituação do eixo HHA.

Por outro lado, a estimulação elétrica, ou química, da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) produz emoções aversivas em humanos (Nashold et al., 1969) e respostas defensivas em animais (Bittencourt *et al.*, 2004; Schenberg *et al.*, 2005) que têm sido propostas como um modelo de ataque de pânico (AP) (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin and Graeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001). Em linha com estes estudos, a tomografia por emissão positrônica de AP induzidos por lactato de sódio também implica o teto do mesencéfalo como o substrato destes ataques (Reiman *et al.*, 1989). Notavelmente, estudos recentes de nosso laboratório mostraram que os níveis plasmáticos de ACTH, CORT e PRL não são alterados pelas respostas vigorosas, físicas e emocionais, dos comportamentos de defesa produzidos pela estimulação elétrica da MCPD de ratos (Silva, 2003; Schenberg *et al.*, 2008). Embora estes resultados sejam indícios convincentes do envolvimento da MCPD na mediação dos AP, verificamos que os ratos implantados com cânulas intra-atriais e eletrodos na MCPD apresentavam níveis de CORT de cerca de 300 ng/ml, valores muito superiores aos esperados para o período matutino (40-100 ng/ml) (Silva, 2003). Embora a ausência da resposta de PRL não possa ser explicada pelos níveis basais elevados de CORT, a ausência das respostas de ACTH e CORT pode ter sido devida à hiperatividade basal do eixo HHA. De fato, estudos posteriores de Lim e colaboradores (2010)

mostraram que ratos com níveis basais reduzidos de CORT apresentam aumentos significativos dos níveis plasmáticos de CORT 30 min após a estimulação da MCPD que produziu comportamentos de fuga. Não obstante, a elevação dos níveis de CORT destes estudos pode ter sido devida ao exercício muscular, e não aos efeitos emocionais da estimulação da MCPD. De fato, embora o desejo de fuga seja um dos sintomas centrais dos AP, a fuga raramente ocorre no pânico clínico.

Portanto, o presente estudo re-examinou as respostas hormonais à estimulação elétrica da MCPD em ratos com níveis normais de CORT e por procedimentos (Schenberg et al., 2005) que permitem separar, por técnicas não invasivas, as respostas motoras e emocionais dos comportamentos de defesa produzidos por estimulação elétrica da MCPD. Adicionalmente, examinamos o efeito desta estimulação sobre alguns índices do metabolismo energético dos animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais – Ratas grávidas provenientes do biotério central da Universidade Federal do Espírito Santo foram transferidas para o biotério “estresse-zero” do Laboratório de Neurobiologia dos Transtornos do Humor e da Ansiedade. Este biotério tinha trânsito limitado de usuários e condições controladas de iluminação (luzes acesas entre 6:00 h e 18:00 h), temperatura (23-25°C) e ruído (basicamente, 46 dB provenientes dos sistemas de condicionamento e exaustão do ar). As ratas foram alocadas em caixas de polipropileno (60 cm x 50 cm x 22 cm) com maravalha no assoalho e livre acesso à água e comida. Um dia após o parto, a prole foi padronizada para, no máximo, 8 filhotes machos por ninhada, sacrificando-se as fêmeas. Na idade adulta, os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno em grupos de até 4 animais por caixa, com livre acesso à água e comida. Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais da UFES (CEUA 099/2011).

Implantação de Eletrodos – Ratos machos adultos (250-300 g) foram implantados com eletrodos confeccionados com um fio de aço inoxidável de 250 µm de diâmetro (Califórnia Fine Wire Company, Grover City, CA, EUA), isolado em toda extensão, exceto na seção transversal de sua extremidade. Um fio de aço inoxidável não isolado servia de eletrodo indiferente. Os eletrodos eram soldados a um soquete de circuito integrado feito com um segmento de 2 pinos de barramento para computador (Celis, BCPT 50, São Paulo, SP, Brasil). Para a cirurgia, os ratos eram anestesiados com quetamina (0,1 ml/ 100 g de rato, I.P.) e xilazina (0,05 ml/100 g de rato, I.P.), tratados com ceftriaxona sódica (30 mg/kg, I.M.) e diclofenaco sódico (1 mg/kg, I.M.), fixados ao aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA) e cobertos com uma manta para evitar a perda de calor. Em seguida, fazia-se a assepsia da parte

superior da cabeça com álcool 70° e solução de iodo e removia-se uma pequena área oval de pele e tecidos subcutâneos, expondo-se a calvária desde o bregma até o lâmbda. Evitou-se a tricotomia, pois o pêlo reduz as lesões da pele ao redor do campo cirúrgico, possivelmente, devidas à autolimpeza. Após a incisão e raspagem da gálea aponeurótica com um bisturi, eram feitos 4 orifícios (2 nos ossos parietais e 2 no osso interparietal), com o auxílio de uma broca odontológica, para a fixação de pequenos parafusos de aço inoxidável e ancoragem da prótese. A seguir realizava-se um orifício -2,1 mm lateralmente e -7,8 mm posteriormente ao bregma para introdução do eletrodo dirigido à MCPD, num ângulo de 15°, até a profundidade de 5 mm abaixo da superfície óssea. Após a soldagem do eletrodo indiferente a um parafuso de fixação e a limpeza e secagem da calota craniana, o campo cirúrgico era preenchido com resina acrílica autopolimerizável de secagem rápida e os ratos eram colocados numa placa térmica (32°C) até se recuperarem da anestesia.

Estimulação intracraniana – As sessões de estimulação intracraniana eram realizadas em arenas cilíndricas de acrílico transparente de 2 tipos: 1) arenas grandes, sem teto, com 60 cm de diâmetro e altura (AGd), 2) arenas pequenas, com teto, com 20,5 cm de diâmetro e 26 cm de altura (APq). A estimulação elétrica era realizada por meio de um cabo flexível acoplado a um conector elétrico giratório de mercúrio. Os pulsos eram aplicados por um estimulador senoidal de corrente constante (FDV, Ribeirão Preto, Brasil) e monitorizados por meio de um osciloscópio (V-121 Hitachi-Denshi, Malásia). Ratos que não exibiram a resposta de galope com intensidades inferiores a 50 µA nas sessões de triagem foram excluídos do experimento.

Tabela 1- Etograma do rato na ausência ou presença de estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal.

Dormir	Postura horizontal com olhos fechados e sem atividade olfativa, e com relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco, cabeça e pescoço e pela flexão dos membros.
Repouso	Postura horizontal com os olhos abertos ou semi-abertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco e pela a flexão dos membros. Com a cabeça erguida o rato assume uma “postura de esfinge”.
Olfação	Jorros de atividade olfativa indicada pela movimento do focinho e vibrissas.
Esquadrinhar	Exploração visuo-motora do ambiente caracterizada por movimentos laterais da cabeça, geralmente acompanhados de olfação.
Autolimpeza	Postura ereta sobre as patas posteriores flexionadas (“rato sentado”) acompanhado de manipulação repetitiva e seqüencial dos pêlos da cabeça, tronco e genitália, usando as patas dianteiras ou a boca.
Levantar	Postura ereta com extensão das patas posteriores.
Marcha	Locomoção lenta do animal com movimentos de apoio e balanço em oposição de fase das patas contralaterais.
Imobilidade (IMO)	Cessar brusco de todos os movimentos, exceto da respiração, freqüentemente acompanhado, da extensão dos membros, elevação do tronco, orelhas e pescoço e, às vezes da cauda, indicando o aumento do tônus muscular. O cessar brusco das atividades podia resultar em posturas anômalas.
Trote (TRT)	Locomoção rápida do animal, mantendo o padrão contralateral da marcha.
Galope (GLP)	Locomoção muito rápida ao longo do perímetro da arena, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores
Salto (SLT)	Impulso vertical ou oblíquo em direção á borda da arena.
Exoftalmia (EXO)	Abertura máxima dos olhos que assume a forma esférica e cor brilhante, presumivelmente, devida a uma maior entrada de luz.
Defecação (DEF)	Eliminação de fezes.
Micção (MIC)	Eliminação de urina

Registro comportamental – Na sessão de triagem, os comportamentos eram avaliados por observação direta de um experimentador posicionado a aproximadamente 50 cm da arena de estimulação. Durante a estimulação, os comportamentos eram registrados de forma binária, como emitidos ou não, independentemente de sua duração ou frequência ao longo de uma única estimulação. Os registros comportamentais foram realizados de acordo com um etograma validado estatisticamente (Bittencourt *et al.*, 2004) (Tabela 1).

Determinação da latência da resposta de ACTH – A latência da resposta de ACTH foi determinada por meio de um estressor clássico, o choque às patas. O equipamento consistia numa caixa retangular (46 cm de largura x 25 cm de altura x 24 cm de profundidade) com assoalho de barras de aço inoxidável, com espaçamento de 1,2 cm, conectadas a um gerador de choque controlado por software (Insight, Ribeirão Preto, Brazil).

Coleta de Sangue – As amostras de sangue eram coletadas ao final dos experimentos, entre 8:00 h e 10:00 h da manhã. Para isto, os ratos eram confinados numa campânula de plástico transparente com 33 cm de diâmetro e 13 cm de altura. A campânula era conectada a um frasco (de 12 cm de altura e 8 cm de diâmetro) com 30 ml de isoflurano, e este a uma bomba nebulizadora cujo acionamento administrava o anestésico por fluxo de superfície (100 ml/s) à taxa de 5 ml/min, produzindo uma mistura ar/isoflurano de 0,08%. Os ratos apresentavam perda completa da postura após 2 ou 3 minutos e eram decapitados com o auxílio de uma guilhotina (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). O sangue era coletado em tubos com 0,5 ml de EDTA (1:50.000) e centrifugado por 10 min, a 2000 rpm e 4°C (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Germany). Após o registro do volume final de plasma de cada amostra para correção do volume

adicionado de EDTA, o plasma era armazenado a -80°C até ser transportado, em gelo seco, para o setor de validação dos laboratórios da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP/CRDB, São Paulo, Brasil), para ser analisado quanto às concentrações de ACTH, CORT, prolactina (PRL), glicose (GLI), triglicérides (TRI) e lactato (LAC), por técnicos completamente desconhecedores dos grupos experimentais. Contudo, como os ensaios de prolactina ainda não foram concluídos, somente parte dos resultados foi mostrada neste estudo.

Histologia – Após a decapitação, as cabeças eram mantidas em formol 10% durante 15 dias. Em seguida, os encéfalos eram retirados das caixas cranianas e seccionados num criostato (Leica CM1850, Wetzlar, Germany) em cortes de $60\ \mu\text{m}$ de espessura. Os cortes eram então estendidos em lâminas gelatinizadas, desidratados, corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e montados com DPX (Aldrich Chemical Company, EUA). Os sítios das estimulações foram identificados, fotografados por microscopia de baixo aumento (Leica DM2500 acoplado a uma câmera DFC 300 FX, Wetzlar, Germany), e registrados em diagramas coronais do encéfalo do rato do atlas de Paxinos e Watson (1998).

Ensaio Bioquímicos – Os níveis plasmáticos de ACTH foram medidos em duplicata por imunoensaio enzimático de quimioluminescência (Immulin 2000[®], Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, EUA) com sensibilidade de $5\ \text{pg/ml}$ e coeficientes de variação (C.V.) intra-ensaio (*single run*) e entre-ensaios (*different runs*) de $7,7\pm 0,6\%$ e $8,4\pm 0,7\%$, respectivamente (média \pm EPM de 5 amostras). A CORT foi medida por radioimunoensaio de anticorpo duplo específico para ratos e camundongos (ImmuChem[®], MP Biomedicals,

Orangeburg, NY, EUA). O ensaio tem sensibilidade de 7,7 ng/ml e C.V. intra- e entre-ensaios de $7,2 \pm 1,7\%$ e $17,4 \pm 7,9\%$, respectivamente (média \pm EPM de 3 amostras). A dosagens de GLI foi realizada por meio de colorimétrico-enzimático (Advia, Siemens) e C.V intra-ensaio e entre-ensaios de 1,3% e 3,3%, respectivamente. O LAC foi analisado por química seca (Vitrus-5600, Johnson&Johnson). E os níveis de TRI foram realizadas por colorimétrico-peroxidase (Advia 2400, Siemens) com C.V intra-ensaio (Controle Baixo: 1,6% Controle Alto: 0,5%) e entre-ensaios de Controle Baixo: 2,4% Controle Alto: 0,9%. Os ensaios foram realizados por técnicos totalmente desconhecedores dos experimentos realizados.

Protocolos experimentais

Experimento 1: Determinação da latência de resposta do ACTH. Ratos adultos ($n=8$) foram previamente “habituaados” à caixa de choque por 3 exposições de 1 min em dias alternados da semana. No dia seguinte, os ratos eram colocados na caixa e, 1 min após, os choques (2 mA, 1 min) eram aplicados às patas dos mesmos. Os controles ($n=8$) receberam choques fictícios. Em seguida, os ratos eram anestesiados e decapitados para coleta de sangue para ensaios hormonais e metabólicos, tal como nos demais experimentos.

Experimento 2: Efeitos hormonais e metabólicos da estimulação elétrica da MCPD com as intensidades limiars das respostas de imobilidade (IMO-AGd) ou galope (GAL-AGd) numa arena grande. Ratos adultos ($n=37$) foram implantados com eletrodos na MCPA e, 2 semanas após, conectados ao cabo

de estimulação e colocados na AGd. Após 10 min de “habituação”, os ratos eram estimulados com pulsos senoidais (60 Hz, 30 s) de intensidade crescente, em passos de 5 μ A e intervalos de 30 s, registrando-se as intensidades limiares das respostas de imobilidade e galope (sessão-triagem). As sessões-teste eram realizadas 14 dias após a sessão-triagem. Para isto, os ratos eram colocados na AGd e estimulados com um único pulso (1 min) na intensidade limiar de imobilidade (IMO-AGd, $n=15$) ou galope (GAL-AGd, $n=20$) registradas na sessão de triagem. Os controles eram estimulados ficticiamente (CTRL-AGd, $n=12$). Ao final da estimulação, os ratos eram anestesiados e decapitados para coleta de sangue.

Experimento 3: Efeitos hormonais e metabólicos da estimulação elétrica da MCPD com a intensidade limiar de galope da arena grande aplicada em ratos colocados numa arena pequena (EIC-APq). Duas semanas após a sessão de triagem na AGd, os ratos eram colocados na APq (EIC-APq, $n=18$) e, 1 min após, estimulados (1 min) com a intensidade limiar do galope registrada na sessão de triagem. Os controles ($n=9$) foram submetidos a procedimentos análogos com estimulação fictícia (CTRL-APq). Ao final da estimulação, os ratos eram anestesiados e decapitados para coleta sanguínea conforme os outros experimentos.

Experimento 4: Efeitos hormonais e metabólicos 30 minutos após a estimulação elétrica da MCPD com a intensidade limiar de galope da arena grande em ratos colocados numa arena pequena (EIC-APq30). Os ratos ($n=4$) foram submetidos aos mesmos procedimentos do Experimento 3, porém, permaneceram na APq por 30 minutos antes do sacrifício. Os controles foram submetidos a procedimentos análogos de estimulação fictícia ($n=4$).

Estatística.

Análise das variáveis binárias – As curvas de probabilidade das respostas de defesa à estimulação elétrica da MCPD foram obtidas pelo ajuste logístico das proporções acumuladas das respostas limiares em função do logaritmo da intensidade de corrente, de acordo com o modelo:

$$P(y_{ij}|x_{ij}) = [1 + \exp(-(\alpha_j + \beta_j x_{ij}))]^{-1}$$

Onde: P é a probabilidade esperada da resposta y_{ij} para um dado estímulo x_{ij} , α_j é o intercepto e β_j a inclinação da *jésima* curva de intensidade resposta (sessões de triagem das arenas grande e pequena). Ajustes logísticos significantes foram avaliados pelo χ^2 de Wald ($\chi^2_w = [\beta/EP]^2$), onde EP é o erro padrão de β_j . As curvas intensidade-resposta foram parametrizadas por meio de variáveis indicadoras (0 e 1) e ajustadas por máxima verossimilhança mediante o procedimento “Logistic” do SAS (SAS®, Cary, EUA).

Os resultados foram descritos pela intensidade limiar mediana da população (I_{50}) e respectivos erro padrão (EP) e intervalo de confiança (IC 95%), como se seguem:

$$I_{50} = 10^{-\alpha/\beta}$$

$$EP\{\text{Log}(I_{50})\} = \{[\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2 \text{Var}(\beta)]/\beta^2\}^{1/2}$$

$$EP(I_{50}) = I_{50}\{EP[\text{Log}(I_{50})]\}$$

$$IC_{95\%}(I_{50}) = I_{50} \pm 1.96\{EP(I_{50})\}$$

Onde, as variâncias (Var) e covariâncias (Cov) dos parâmetros foram obtidas pela matriz estimada de covariância do procedimento Logistic. A descrição detalhada destes métodos pode ser encontrada em Collett (2003).

Por outro lado, enquanto nas sessões-triagem os ratos foram estimulados com todas intensidades inferiores ao limiar de galope, nas sessões-teste os ratos somente foram estimulados com a intensidade de galope registrada na sessão-triagem. Conseqüentemente, não foi possível ajustar funções intensidade-resposta das sessões-teste devido ao número reduzido de ratos por intensidade de estimulação (1 a 5 ratos por intensidade, apenas). Portanto, a comparação das sessões-triagem e sessões-teste foi feita de forma indireta. Para isto, utilizamos as funções ajustadas das respostas de defesa (imobilidade, trote, galope, etc) das sessões-triagem para estimar as proporções esperadas de respostas que seriam obtidas com intensidade média das sessões-teste (APq=40,7 μ A, AGd=40,5). Em seguida, comparamos as proporções esperadas e observadas pelo teste do χ^2 de Pearson:

$$\chi^2 = (E - O)^2 / E$$

Análise das variáveis contínuas – As concentrações plasmáticas dos hormônios foram corrigidas para o volume adicionado de EDTA (0,5 ml). Em seguida, os ratos que apresentaram valores extremos (*outliers*) de CORT ($n=1$) foram excluídos por meio de análise do resíduo normal máximo (*maximum normed residual*) para $P < 0,05$ (Snedecor and Cochran, 1982). Os dados restantes ($n=188$) foram tratados por análise de variância (ANOVA), ou análise de covariância (ANCOVA) em função da concentração plasmática de lactato.

Os grupos foram comparados por testes-t de Bonferroni (5%) das médias mínimas quadráticas (*least square means*).

RESULTADOS

Experimento 1: Determinação da latência de resposta do ACTH. A aplicação de choques nas patas por 1 min causou aumentos marcantes dos níveis de ACTH 2 min após o término dos choques ($F_{2,21}=29,34$; $P<0,0001$) (Fig 1). Também houve alterações significativas dos níveis plasmáticos de GLI ($F_{2,21}=15,81$; $P<0,0001$) e LAC ($F_{2,21}=47,49$; $P<0,0001$) (Fig. 1).

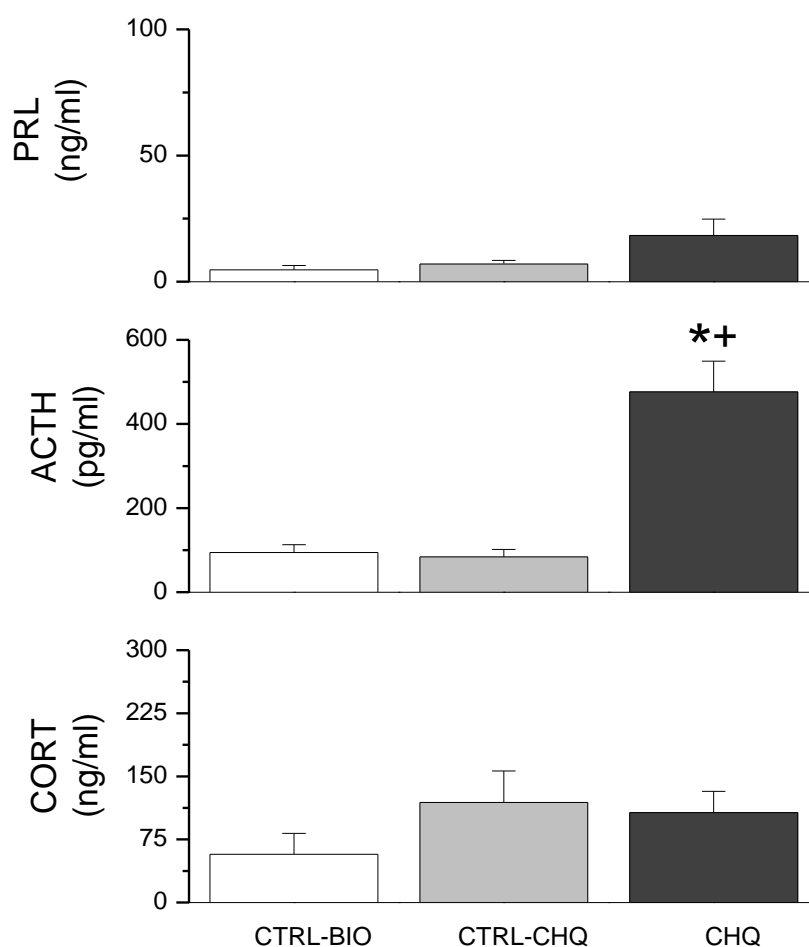


Figura 1 – Níveis plasmáticos de corticosterona (CORT), adrenocorticotrofina (ACTH) e prolactina (PRL) em controles virgens (CTRL-BIO), controles com choque fictício (CTRL-CHQ) ou ratos que receberam choques nas patas de 2 mA e 1 min de duração (CHQ). Os símbolos indicam diferenças significantes em relação aos grupos CTRL-BIO (*) e CTRL-CHQ (+) (critério de 5% Bonferroni).

Aumentos moderados foram observados (162%), porém marginalmente significantes ($F_{2,14}=2,87$; $P<0,09$), dos níveis de PRL. Em contraste, não foram observados efeitos significantes nos níveis de CORT e TRI.

Os níveis plasmáticos de GLI, ACTH e LAC no grupo choque foram significativamente maiores que os do grupo CTRL-BIO ($P<0,0001$) (Fig.3).

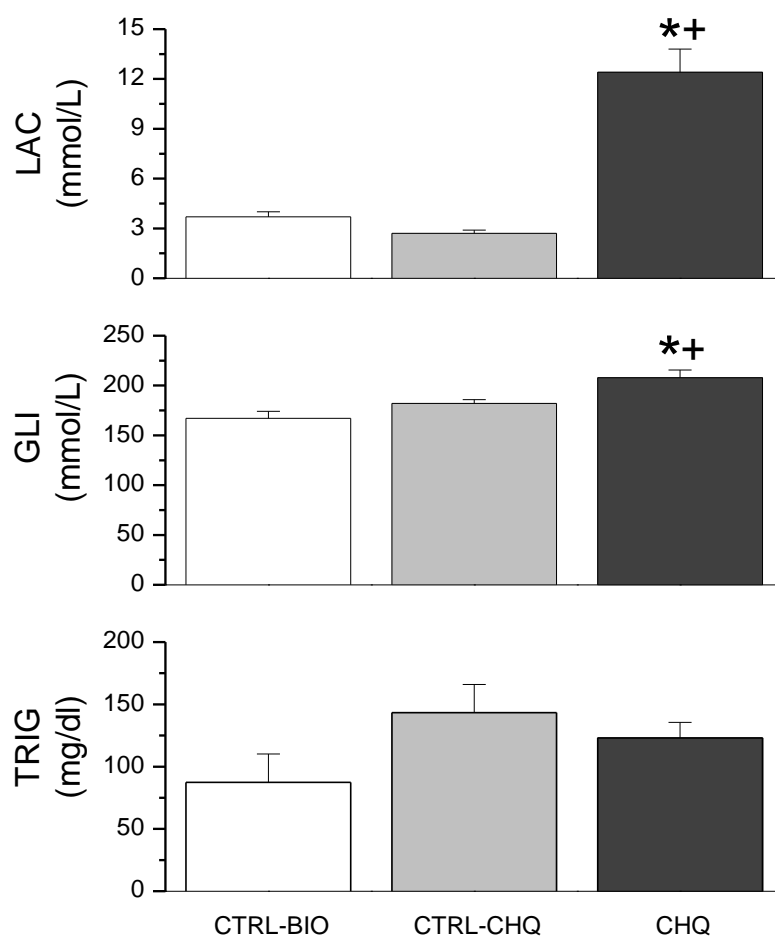


Figura 2 – Níveis plasmáticos de lactato (LAC), glicose (GLI) e triglicérides (TRI) em controles virgens (CTRL-BIO), controles com choque fictício (CTRL-CHQ) ou ratos que receberam choques na patas de 2 mA e 1 min de duração (CHQ). Os símbolos indicam diferenças significantes em relação aos grupos CTRL-BIO (*) e CTRL-CHQ (+) (critério de 5% Bonferroni).

Os ratos do grupo CHQ também apresentaram níveis significativamente maiores de ACTH ($P<0,0001$), GLI ($P<0,005$) e LAC ($P<0,0001$) comparados ao grupo CTRL-CHQ.

A análise de covariância (ANCOVA) dos níveis hormonais e dos metabólitos em função dos níveis de LAC também revelou diferenças significantes entre grupos para o ACTH ($F_{2,20}=5,39$; $P<0,01$) e para GLI ($F_{2,20}=8,97$; $P<0,001$). Contudo, estas alterações não foram correlacionadas aos níveis de LAC. De forma similar à ANOVA, também não foram observadas diferenças significantes para os níveis de CORT e TRI (Fig. 2). As comparações das médias ajustadas revelaram que o grupo CHQ apresentou níveis aumentados de ACTH em relação aos grupos CTRL-BIO ($P<0,005$) e CTRL-CHQ ($P<0,01$). Contudo, a comparação das médias ajustadas de GLI só revelou diferenças significantes entre os grupos CHQ e CTRL-BIO ($P<0,005$) (Fig.3).

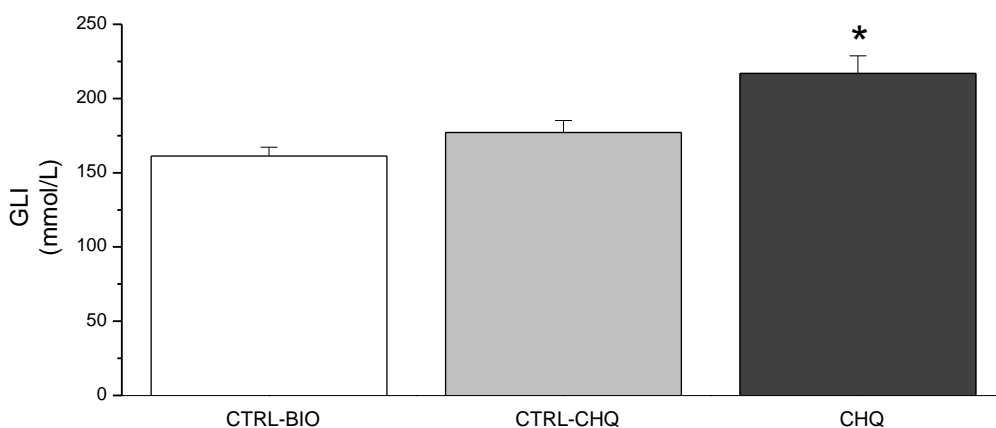


Figura 3 – Concentrações plasmáticas de glicose (GLI) ajustadas em função dos níveis de lactato em controles virgens (CTRL-BIO) e ratos submetidos a choques fictícios (CTRL-CHQ) ou choques de 2 mA e 1 min de duração (CHQ). *, diferença significativa em relação ao grupo CTRL-BIO (critério de 5% de Bonferroni).

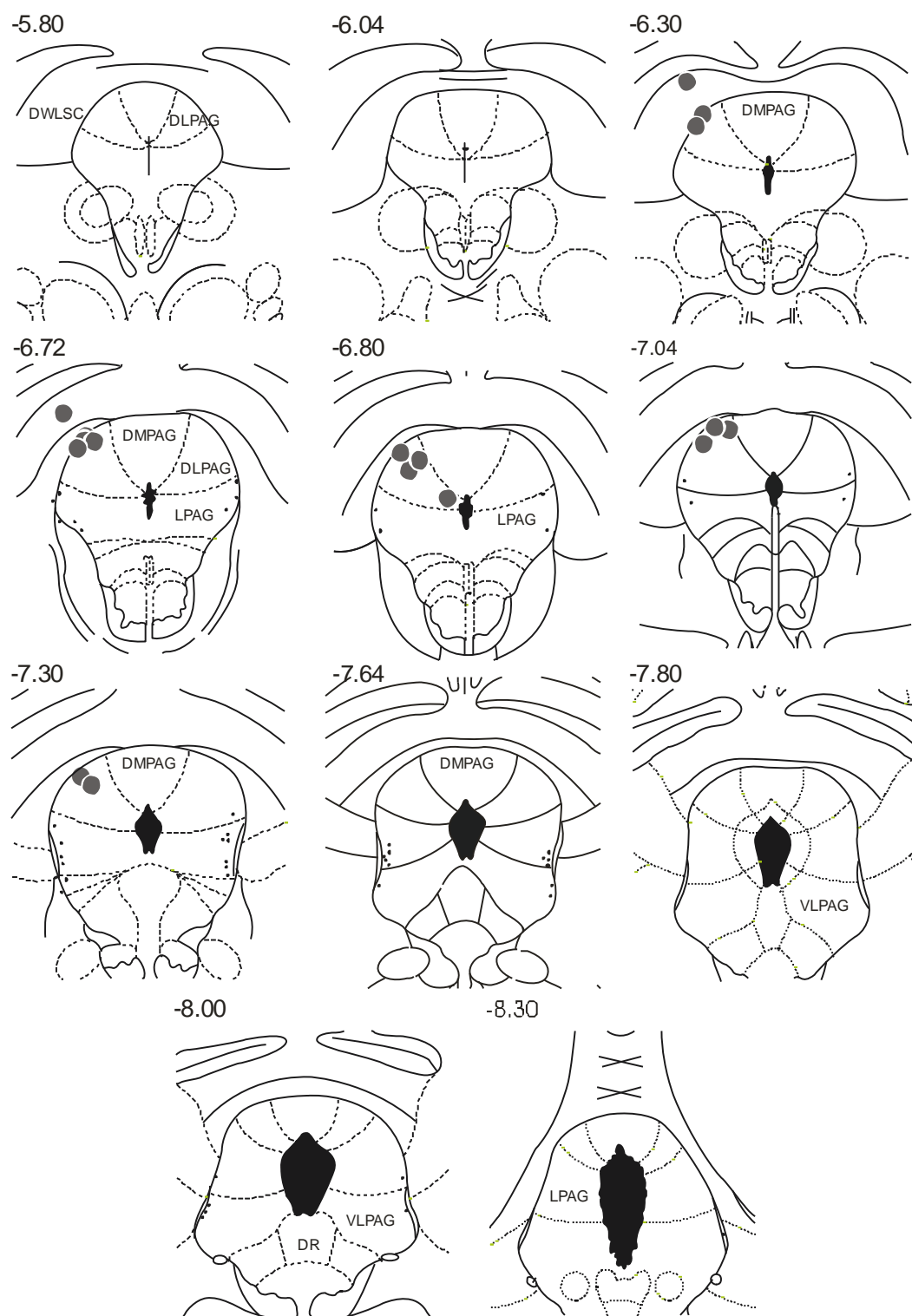


Figura 4. Localização dos eletrodos dos ratos estimulados na arena pequena com a intensidade limiar da resposta de galope da arena grande. Os números representam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma de cortes coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998).

Sítios estimulados: Os eletrodos do grupo APq localizaram-se predominantemente na coluna dorsolateral da MCPA (89%) Os restantes localizaram-se em áreas contíguas das camadas profundas do colículo superior (11%) (Fig. 4.).

No grupo estimulado com as intensidades limiares de galope e imobilidade na AGd, os eletrodos localizaram-se predominantemente nas colunas dorsolateral e dorsomedial da MCPA. Os restantes localizaram-se em áreas contíguas das camadas profundas do colículo superior (Tabela 2, Fig. 5).

Tabela 2. Distribuição dos eletrodos dos grupos estimulados na AGd com as intensidades limiares de imobilidade (IMO) e galope (GAL) e que foram incluídos nos experimentos com hormônios. MCPDL e MCPDM – colunas dorsolateral e dorsomedial da matéria cinzenta periaquedutal, CBPCS – camada branca profunda do colículo superior.

	MCPDL	MCPDM	CBPCS	Total
IMO	10	1	3	14
%	72	7	21	100
GAL	19	---	2	21
%	90,5	---	9,5	100
Total	29	1	5	35
%	83	3	14	100

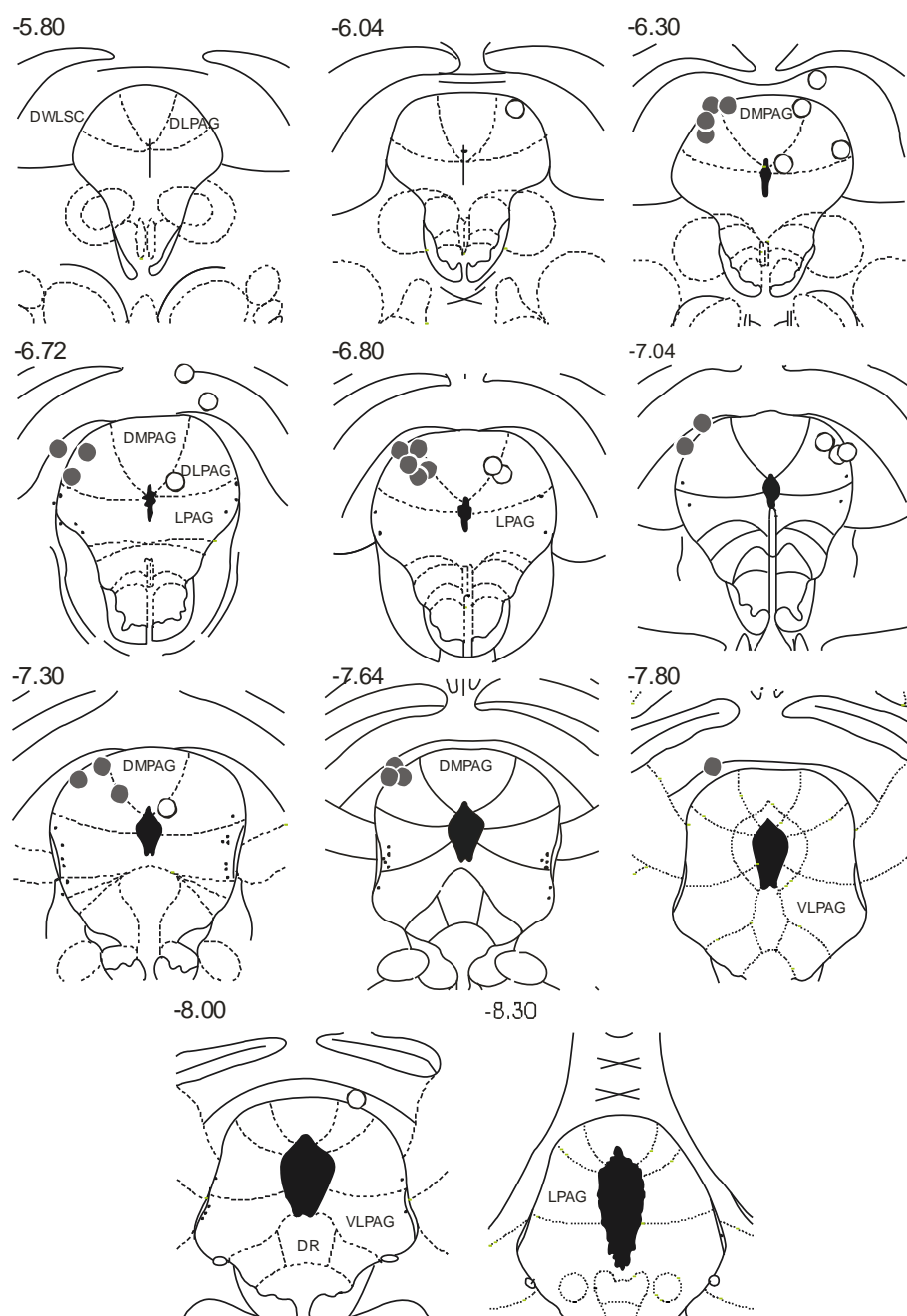


Figura 5 – Localização dos eletrodos dos ratos estimulados na arena grande com as intensidades limiares das respostas de galope (●) e imobilidade (○). Embora todos os eletrodos tenham sido implantados no lado direito do cérebro, eles foram representados em lados distintos para melhor visualização. Os números representam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma de cortes coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998).

Experimento 2: Efeitos hormonais e metabólicos da estimulação elétrica da MCPD na arena grande nas intensidades limiars das respostas de imobilidade (IMO-AGd) ou galope (GAL-AGd). O tratamento dos dados por ANOVA detectou diferenças significativas para as concentrações plasmáticas de CORT ($F_{4,67}=3,26$; $P<0,01$) e ACTH ($F_{4,67}=2,66$; $P<0,05$) (Fig. 6), mas não para a PRL, GLI e TRI.

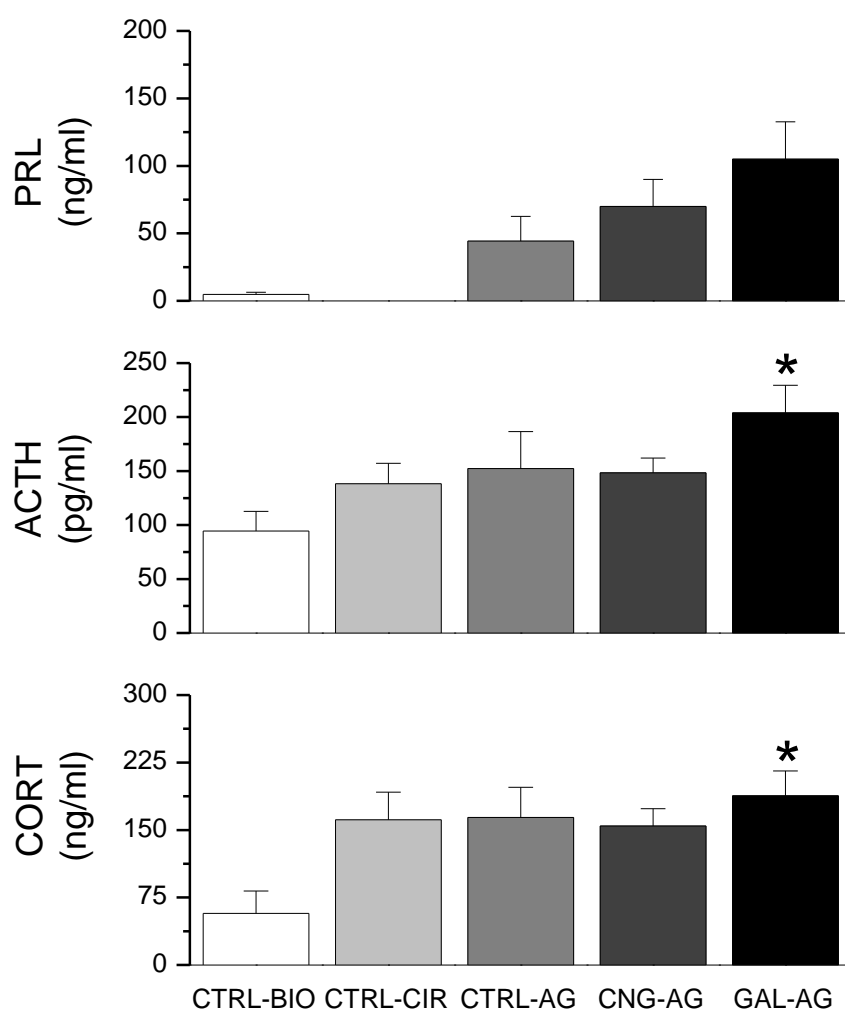


Figura 6 – Níveis plasmáticos de corticosterona (CORT), adrenocorticotrofina (ACTH) e prolactina (PRL) em ratos controle biotério (CTRL-BIO), ratos controle de cirurgia (CTRL-CIR), ratos controle de arena grane (CTRL-AGd), ratos estimulados no limiar de imobilidade na rena grande (IMO-AGd) e ratos estimulados no limiar de galope na arena grande (GAL-AGd)* diferente do CTRL-BIO ($P<0,05$); critério de Bonferroni.

Estas diferenças foram devidas aos níveis plasmáticos aumentados de CORT ($P<0,001$) e ACTH ($P<0,005$) do grupo GAL-AGd em relação aos ratos CTRL-BIO. A ANOVA também mostrou diferenças significativas para os níveis plasmáticos de LAC ($F_{4,67}=11,51$; $P<0,0001$).

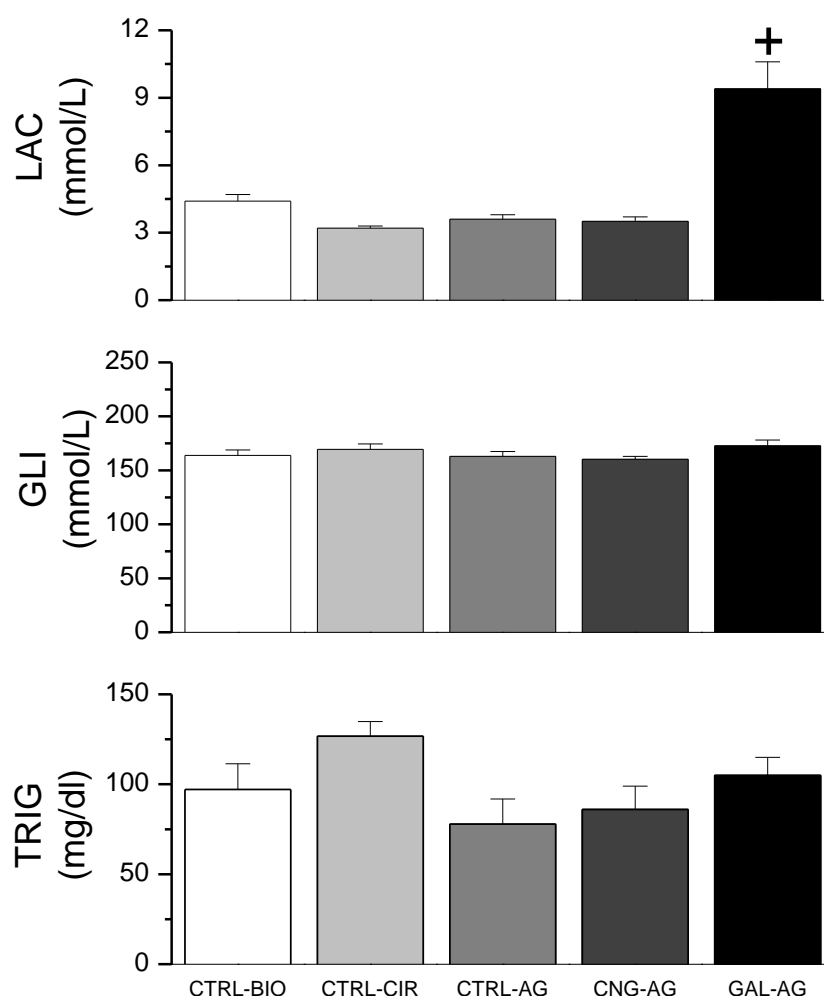


Figura 7 – Níveis plasmáticos de triglicérides (TRI), glicose (GLI) e lactato (LAC) em ratos controle de biotério (CTRL-BIO), ratos controle de cirurgia (CTRL-CIR), ratos controle de arena grane (CTRL-AGd), ratos estimulados no limiar de imobilidade na rena grande (IMO-AGd) e ratos estimulados no limiar de galope na arena grande (GAL-AGd). + Diferente do CTRL-BIO, CTRL-CIR, CTRL-AGd, CNG-AGd. ($P<0,05$); critério de Bonferroni.

A comparação entre grupos mostrou que estas diferenças foram devidas ao aumento no nível plasmático de LAC do grupo GAL-AGd em relação aos

grupos CTRL-BIO ($P<0,0005$), CTRL-CIR ($P<0,0001$), CTRL-AGd ($P<0,0001$) e CNG-AGd ($P<0,0001$) (Fig.7).

O tratamento dos dados por ANCOVA detectou correlações apenas marginais dos níveis de LAC com as respostas de CORT ($F_{1,66}=3,28$; $P<0,07$). Desta forma, a ANCOVA forneceu resultados similares aos da ANOVA, detectando diferenças significantes das concentrações deste hormônio ($F_{4,66}=4,19$; $P<0,005$). A comparação entre grupos mostrou que estas diferenças foram devidas aos níveis mais elevados de CORT do grupo GAL-AGd em relação ao grupo CTR-BIO ($P<0,0001$). Também foram observadas diferenças marginais ($P<0,07$) entre os grupos CTR-BIO e GAL-AGd e os demais (Fig.8).

Em contraste, os níveis plasmáticos de LAC contribuíram de forma significativa nas respostas de ACTH ($F_{1,66}=4,47$; $P<0,03$). Portanto, ao contrário do observado para a ANOVA, não foram detectadas diferenças significantes nas concentrações ajustadas para o mesmo nível de LAC ($F_{4,66}=1,1$; $P<0,35$). Os níveis de GLI também se correlacionaram fortemente com os níveis de LAC ($F_{1,66}=17,7$; $P<0,0001$). Conseqüentemente, não houve diferenças significativas nas médias ajustadas de GLI ($F_{5,66}=1,2$; $P<0,35$). Por fim, o LAC não teve influência significativa nos níveis de TRI ou PRL. (Fig. 9).

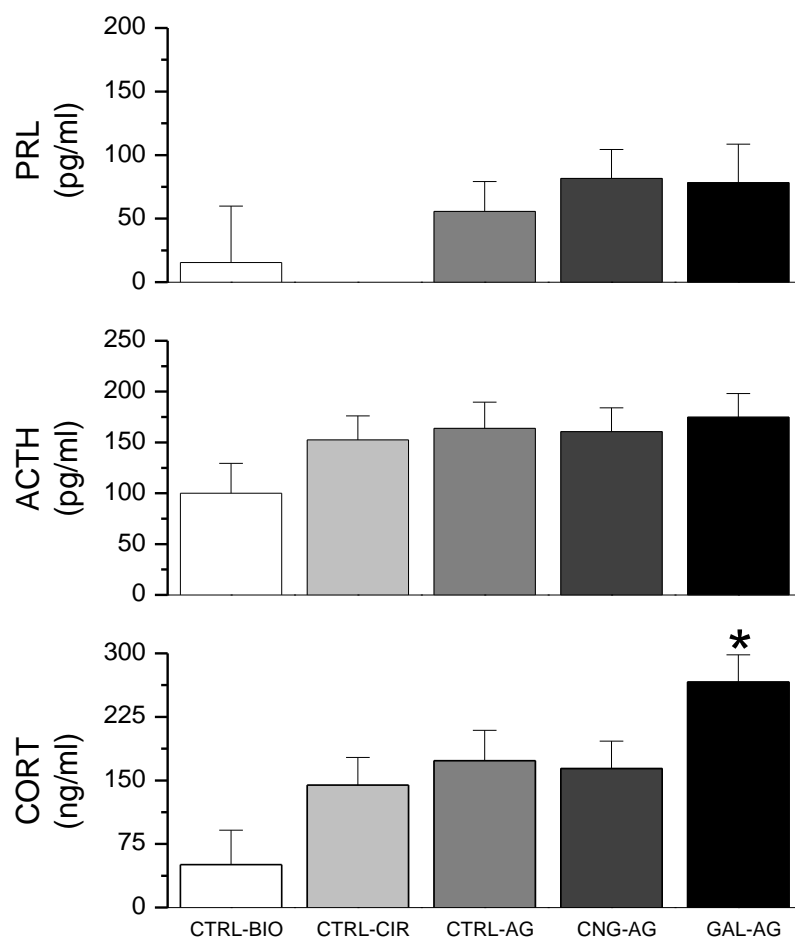


Figura 8 – Níveis plasmáticos de corticosterona (CORT), adrenocorticotrofina (ACTH) e prolactina (PRL) ajustadas em função do exercício físico (lactato), em ratos controle de biotério (CTRL-BIO), ratos controle de cirurgia (CTRL-CIR), ratos controle de arena grande (CTRL-AGd), ratos estimulados no limiar de imobilidade na arena grande (IMO-AGd) e ratos estimulados no limiar de galope na arena grande (GAL-AGd). * Diferente de CTRL-BIO ($P < 0,05$); critério de Bonferroni.

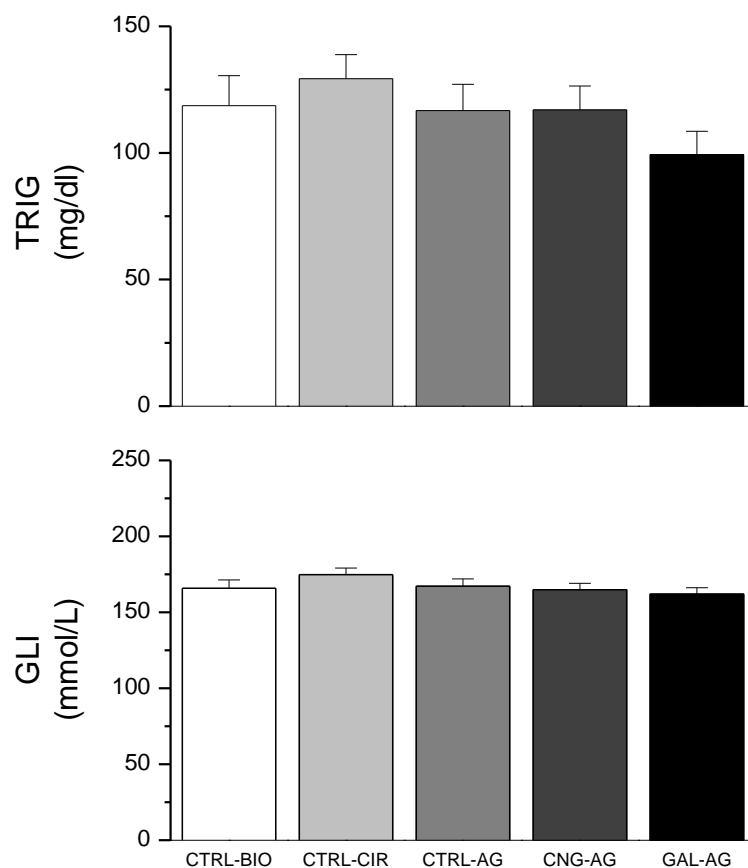


Figura 9 – Níveis plasmáticos de triglicérides (TRI) e glicose (GLI) ajustados em função do exercício físico (lactato), em ratos controle de biotério (CTRL-BIO) ratos controle de cirurgia (CTRL-CIR), ratos controle de arena grane (CTRL-AGd), ratos estimulados no limiar de imobilidade na arena grande (IMO-AGd) e ratos estimulados no limiar de galope na arena grande (GAL-AGd).

Experimento 3: Efeitos hormonais e metabólicos da estimulação elétrica da MCPD com a intensidade limiar de galope da arena grande aplicada em ratos colocados numa arena pequena (EIC-APq). Foram observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de CORT ($F_{3,47}=7,64$; $P<0,0005$) e LAC ($F_{3,46}=3,66$; $P<0,01$) (Fig.10).

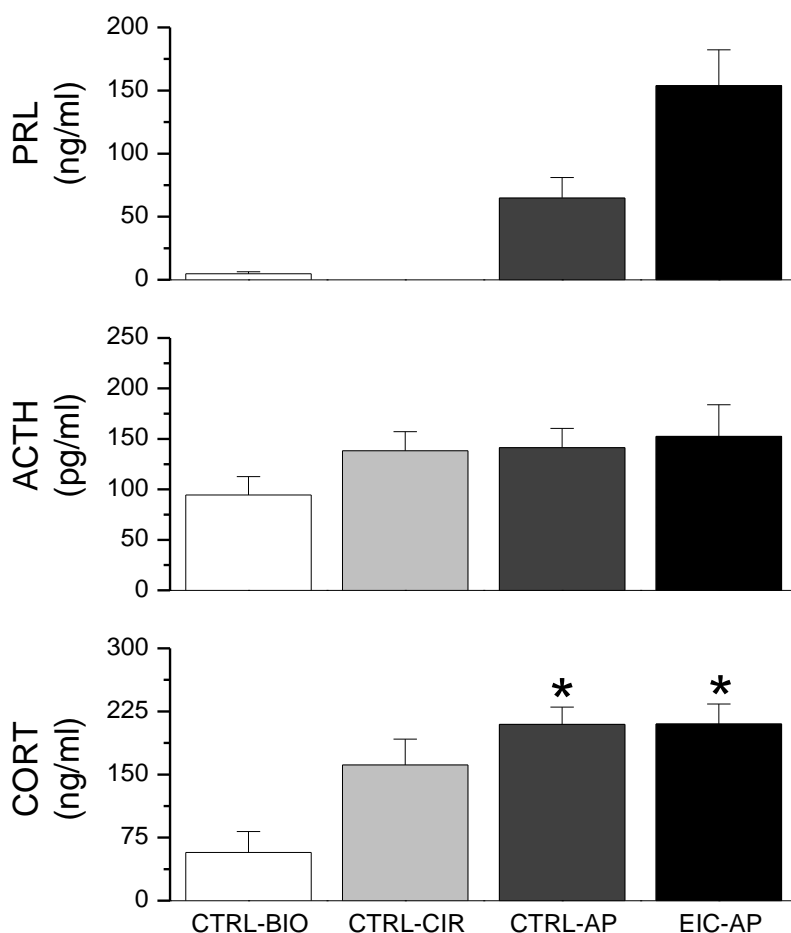


Figura 10 – Níveis plasmáticos de corticosterona (CORT), adrenocorticotrofina (ACTH) e prolactina (PRL) em ratos controle de biotério (CTRL-BIO), ratos controle de cirurgia (CTRL-CIR), ratos controle de arena pequena (CTRL-APq) e ratos estimulados no limiar de galope na arena pequena (EIC-APq)* diferente do CTRL-BIO ($P<0,05$); critério de Bonferroni.

As diferenças nos níveis de CORT foram devidas aos aumentos nos níveis plasmáticos de CORT nos grupos CTRL-APq ($P<0,0005$) e EIC-APq

($P < 0,0001$) em relação ao CTRL-BIO (Fig.8). Adicionalmente, os níveis de LAC do grupo EIC-APq foram significativamente maiores que aqueles do grupo CTRL-CIR ($P < 0,005$) (Fig.11). Não foram observadas diferenças significativas para os níveis plasmáticos de PRL, GLI e TRIG.

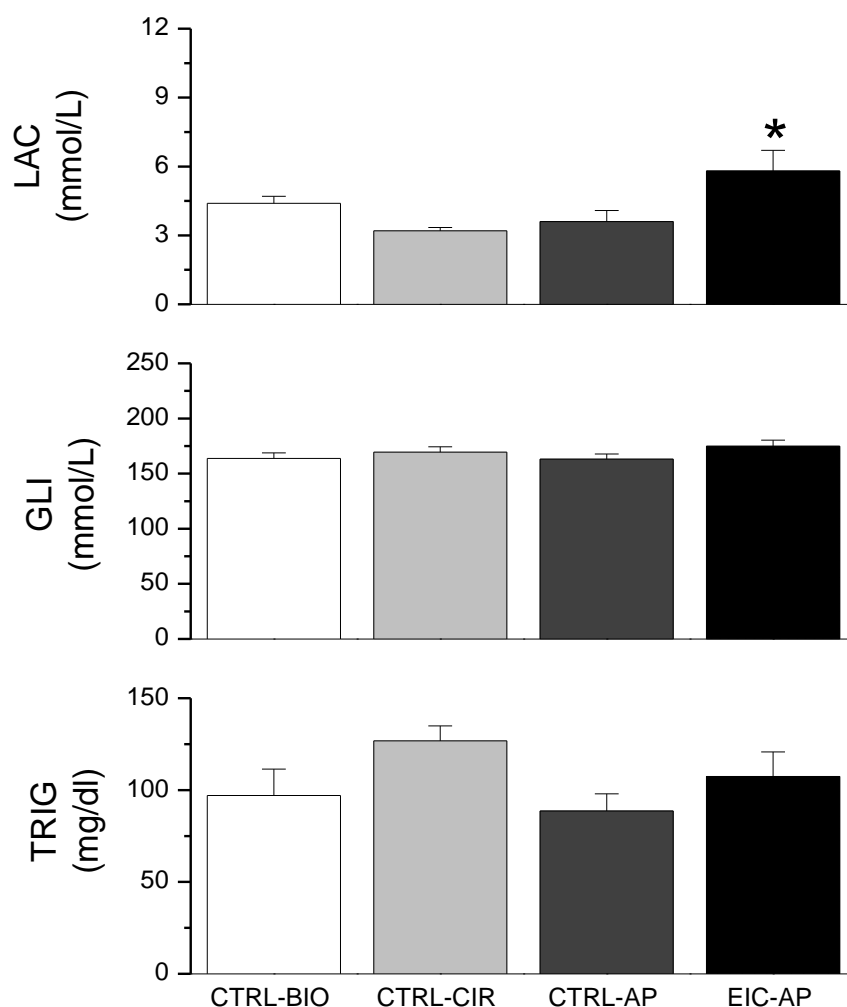


Figura 11 – Níveis plasmáticos de triglicérides (TRI), glicose (GLI) e lactato (LAC) em ratos controle de biotério (CTRL-BIO), ratos controle de cirurgia (CTRL-CIR), ratos controle de arena pequena (CTRL-APq) e ratos estimulados na arena pequena (EIC-APq) com a intensidade limiar de galope registrada na arena grande.(+), estatisticamente diferente do CTRL-CIR (critério de 5% de Bonferroni).

O tratamento dos dados de CORT por ANCOVA corroborou os resultados da ANOVA, detectando diferenças significativas entre grupos ($F_{3,45}=7,39$;

$P<0,0005$). Contudo, não houve nenhuma correlação significativa entre os níveis de LAC e CORT. Em contraste, o LAC correlacionou-se de forma significativa com as concentrações de ACTH ($F_{1,45}=27,5$; $P<0,0001$) e GLI ($F_{1,45}=13,39$; $P<0,001$) (Fig.12).

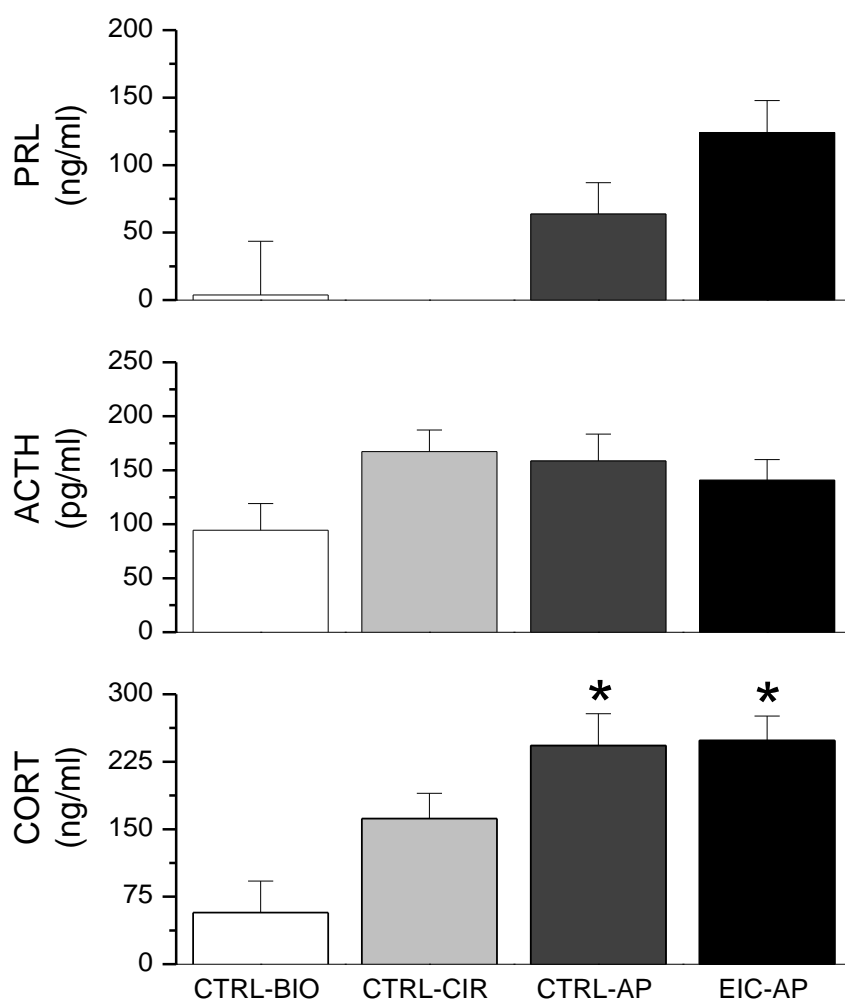


Figura 12 – Níveis plasmáticos de corticosterona (CORT), adrenocorticotrofina (ACTH) e prolactina (PRL) ajustados em função do exercício físico (níveis lactato), em controles virgens (CTRL-BIO), controles operados (CTRL-CIR), controles confinados por 1 min na arena pequena (CTRL-APq) e ratos estimulados na arena pequena (GAL-APq) com a intensidade limiar de galope registrada na arena grande. (*) estatisticamente diferente do CTRL-BIO (critério de 5% de Bonferroni).

Contudo, tal como na ANOVA, não foram detectadas diferenças significantes entre as médias ajustadas tanto do ACTH quanto da GLI. Tampouco foram observadas diferenças significativas das médias ajustadas de TRI e PRL.

Os níveis plasmáticos de ACTH e GLI foram correlacionados com os níveis de LAC ($P<0,0001$ e $P<0,001$, respectivamente) e a diferença estatística nestes grupos observada no teste de ANOVA foi anulada pela correlação dos níveis de lactato plasmáticos (Fig. 13).

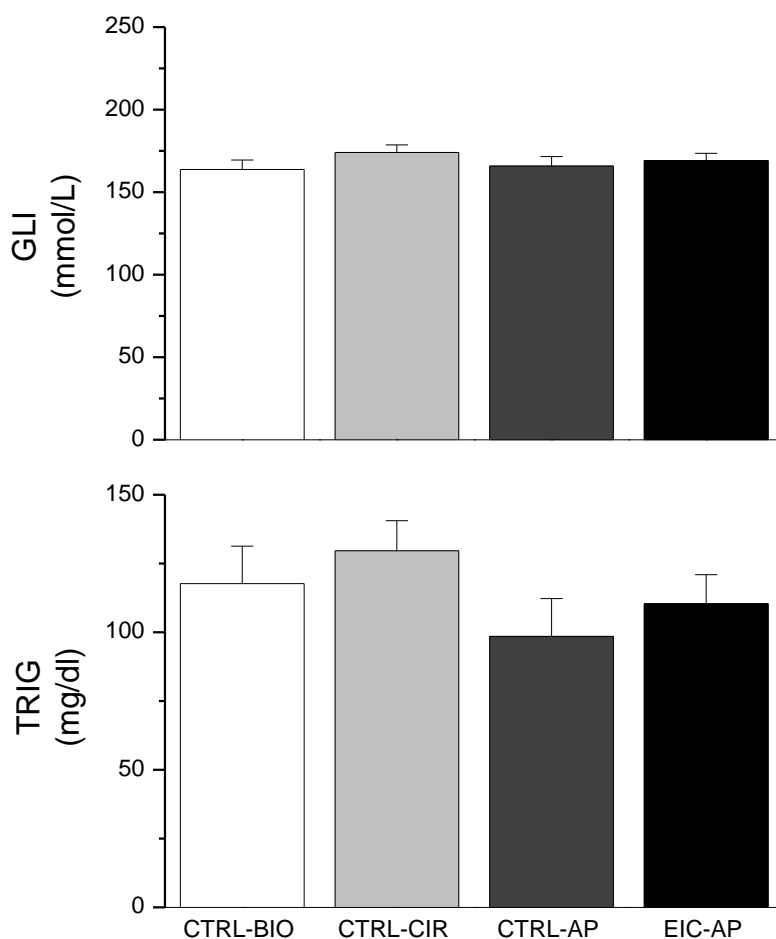


Figura 13 – Níveis plasmáticos de glicose (GLI) e triglicérides (TRI) ajustados em função do exercício físico (lactato) em controles virgens (CTRL-BIO), controles operados (CTRL-CIR), controles confinados na arena pequena (CTRL-APq) e ratos estimulados na arena pequena (GAL-APq) com a intensidade limiar de galope registrada na arena grande.

Experimento 4: Efeitos hormonais e metabólicos 30 minutos após a estimulação elétrica da MCPD de ratos confinados numa arena pequena com a intensidade limiar de galope registrada na arena grande. O tratamento dos dados por ANOVA detectou diferenças significativas para os níveis plasmáticos de CORT ($F_{3,28}=35,68$; $P<0,0001$), ACTH ($F_{3,28}=13,7$; $P<0,0001$) e LAC ($F_{3,28}=8,22$; $P<0,0005$) e TRI ($F_{3,28}=3,05$; $P<0,05$) (Fig.14).

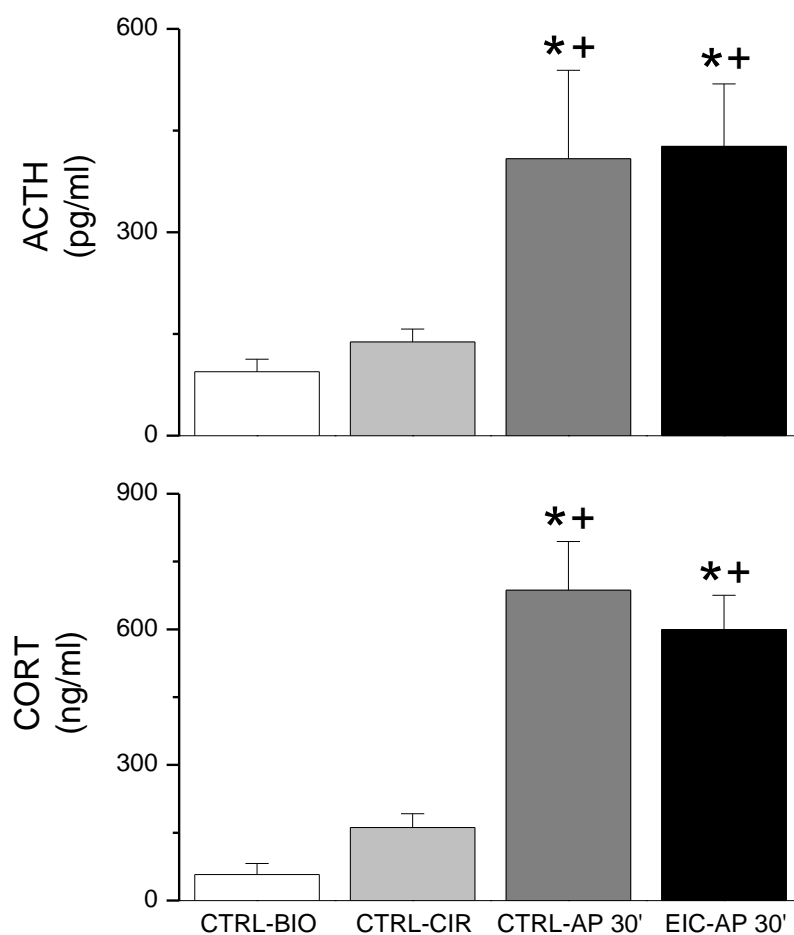


Figura 14 – Níveis plasmáticos de corticosterona (CORT) e adrenocorticotrofina (ACTH) dos controles virgens (CTRL-BIO), controles operados (CTRL-CIR), controles confinados por 30 min na arena pequena após a estimulação fictícia da MCPD (CTRL-APq 30') e de ratos confinados por 30 min na arena pequena após a estimulação da MCPD com a intensidade limiar de galope registrada na arena grande (EIC-APq 30'). Símbolos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos CTRL-BIO (*) e CTRL-CIR (+) (critério de 5% de Bonferroni $P<0,05$).

Contudo, não houve alteração significativa dos níveis plasmáticos de GLI (Fig 15). A diferença nos níveis de CORT foi devida ao aumento expressivo deste hormônio nos grupos CTRL-APq-30' e EIC-APq-30' em relação os animais CTRL-CIR e CTRL-BIO ($P<0,0001$).

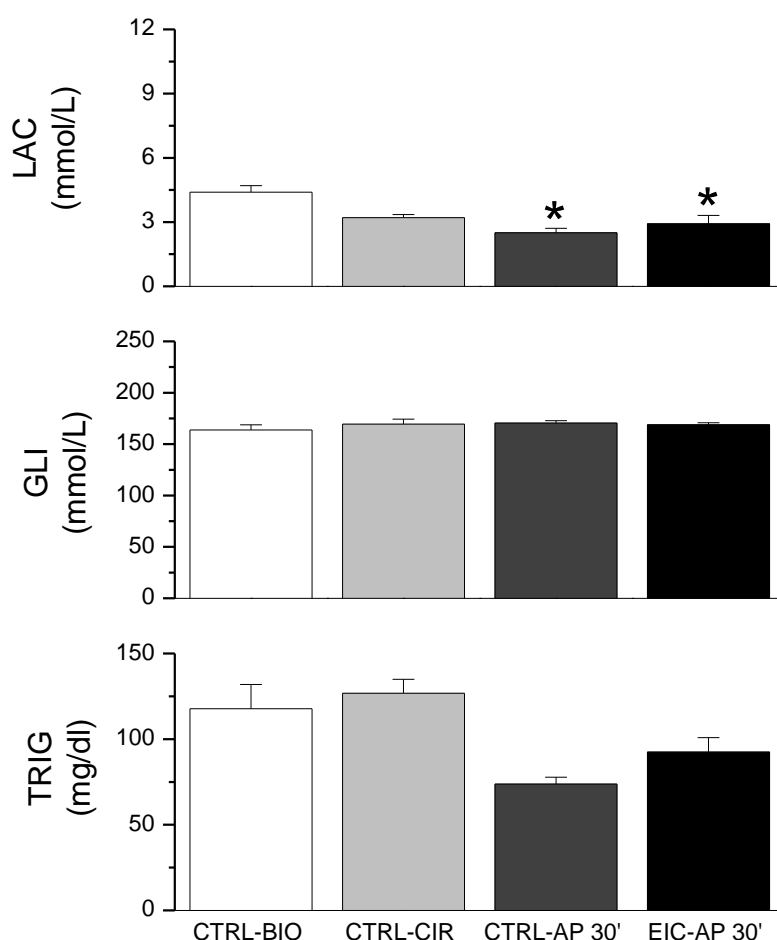


Figura 15 – Níveis plasmáticos de glicose (GLI), triglicérides (TRI) e lactato(LAC) dos controles virgens (CTRL-BIO), controles operados (CTRL-CIR), controles confinados por 30 min na arena pequena após a estimulação fictícia da MCPD (CTRL-APq 30') e de ratos confinados por 30 min na arena pequena após a estimulação da MCPD com a intensidade limiar de galope registrada na arena grande (EIC-APq 30'). Símbolos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos CTRL-BIO (*) e CTRL-CIR (+) (critério de 5% de Bonferroni $P<0,05$).

Os níveis plasmáticos de ACTH também foram significativamente maiores nos animais CTRL-APq-30' em relação aos grupos CTRL-CIR ($P<0,001$) e CTRL-

BIO ($P<0,0005$). De forma similar, o grupo EIC-APq-30' apresentou valores de ACTH significativamente maiores que os grupos CTRL-CIR e CTRL-BIO ($P<0,0001$).

As diferenças dos níveis de plasmáticos de LAC foram devidas aos níveis superiores no grupo CTRL-BIO em relação aos grupos CTRL-APq 30' ($P<0,0005$) e EIC-APq 30' ($P<0,001$; Fig. 13).

Análise comportamental de animais submetidos a estimulação elétrica da MCPA no limiar da resposta de galope em arena grande e arena pequena.

Tabela 3: Proporções das respostas de defecação (DEF), exoftalmia (EXO), galope (GLP), ratação (ROT) imobilidade (IMO), Micção (MIC), salto (SLT) trote (TRT) apresentadas na 2ª semana e na 4ª semana em Arena Grande (AG) e Arena Pequena (AP).

		Proporções de Respostas		
		2ª Semana	4ª Semana	P
Arena Grande	DEF	0,10±0,07	0,73±0,09	0,0001
	EXO	0,88±0,07	1,00±0	0,0541
	GLP	0,65±0,1	0,86±0,07	0,0496
	IMO	0,85±0,08	1,00±0	0,0310
	MIC	0,24±0,09	0,73±0,09	0,0008
	SLT	0,58±0,11	0,86±0,07	0,0203
	TRT	0,59±0,1	0,82±0,08	0,0502
Arena Pequena	DEF	0,32±0,1	0,52±0,11	ns
	EXO	0,93±0,06	0,95±0,05	ns
	GLP/ROT	0,67±0,1	0,23±0,09	0,0018
	IMO	0,88±0,07	0,95±0,05	ns
	MIC	0,21±0,09	0,09±0,06	ns
	SLT	0,57±0,11	0,45±0,11	ns
	TRT	0,45±0,11	0,00±0	0,0002

As proporções foram comparadas por desvio da curva normal (Collet; 2003).

Está análise mostrou no grupo AG, tanto as respostas autonômicas (DEF e MIC) quanto as respostas somáticas (EXO, GLP, IMO, SLT e TRT) foram

fortemente aumentadas pela estimulação súbita de 1minuto da MCPA na 4ª semana, em relação àquela registradas na seção triagem (2ª semana). Por outro lado, não foram observadas diferenças entre esses períodos na AP, exceto para os comportamentos virtualmente abolidos de TRT e GLP/ROT (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Estudos anteriores do nosso laboratório compararam as respostas neuroendócrinas induzidas pela estimulação elétrica da MCPD às respostas do estresse de restrição em tubos de 4,5 cm de diâmetro (Silva, 2003; Schenberg et al., 2008). Contudo, as comparações foram prejudicadas pelas durações bastante distintas do estímulo intracraniano (1 min) e estresse de restrição (10 min). No presente estudo procuramos minimizar os efeitos da exposição ao ambiente estranho coletando o sangue imediatamente após (2 min) o término da estimulação da MCPD. Portanto, precisávamos saber se os efeitos hormonais já podiam ser detectados neste intervalo de amostragem. Para isto, examinamos a latência das respostas neuroendócrinas de um estressor clássico – o choque nas patas – de mesma duração da estimulação intracraniana (1 min). Os resultados mostraram que o ACTH já está expressivamente aumentado (466%) 2 min após o término do choque nas patas, principalmente, considerando-se a duração curta do estímulo. De fato, Hauger e colaboradores (1988) mostraram que o ACTH pode aumentar em até 23 vezes após 15 min de imobilização. Também foram observados aumentos moderados (162%), porém, marginalmente significantes ($P < 0,09$), dos níveis de PRL. Em contraste, não foram detectadas diferenças nos níveis de CORT. Apesar da ausência de alterações nos níveis de CORT, os níveis circulantes de GLI e seu metabólito, o LAC, foram significativamente aumentados no grupo CHQ, tanto em relação ao CTR-CHQ quanto CTR-BIO, possivelmente, devido à descarga maciça de catecolaminas do sistema nervoso simpático e medula adrenal. Por outro lado, evidências mostram que o exercício físico intenso aumenta as concentrações circulantes de glicocorticoides (Girard et al., 2002), em parte, devido ao aumento dos níveis de LAC. Aferentes nervosos que sinalizam o trabalho muscular também são essenciais para a ativação do eixo

HHa durante o exercício físico (Kjaer et al.1996). Neste sentido, o desaparecimento das diferenças entre os grupos CHQ e CTR-CHQ para as médias ajustadas para o mesmo nível de LAC sugere uma influência importante do exercício muscular no aumento dos níveis circulantes de GLI.

Nos grupos com estimulação intracraniana na AGd, os eletrodos localizaram-se predominantemente na coluna dorsolateral da MCPA e áreas imediatamente adjacentes da coluna dorsomedial desta estrutura e camada branca profunda do colículo superior. Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que a estimulação senoidal não é capaz de discriminar as respostas de defesa destas áreas (Bittencourt et al., 2004). Portanto, a distribuição homogênea dos eletrodos endossa a comparação das respostas hormonais destes grupos. No grupo AG, tanto as respostas autonômicas (DEF e MIC) quanto as respostas somáticas (EXO, GLP, IMO, SLT e TRT) foram fortemente aumentadas pela estimulação súbita de 1 minuto da MCPA na 4ª semana, em relação à seção triagem (2ª semana). Esta relação já foi observada em estudo anterior de nosso laboratório (Sudré et al., 1993). Contudo, os níveis de ACTH e CORT sofreram aumentos leves ou moderados (114% e 300%, respectivamente) nos ratos que apresentaram respostas de galope à estimulação da MCPD quando comparados aos controles virgens. Embora os outros grupos também tenham apresentado aumentos marginais dos níveis de CORT ($0,05 < P < 0,07$) em relação aos controles virgens, eles não diferiram entre si tanto em relação a este hormônio quanto ao ACTH. Portanto, enquanto os primeiros resultados sugerem a ativação do eixo HHA na resposta do galope, os últimos resultados excluem sua ativação na resposta de congelamento. Contudo, os níveis de LAC também foram significativamente aumentados na resposta de galope, sugerindo a influência determinante do

exercício físico. De fato, as concentrações de ACTH não diferiram dos controles virgens e foram virtualmente idênticas para os grupos operados quando elas foram ajustadas para o mesmo nível de LAC. Os resultados da ANCOVA sugerem que as respostas foram secundárias ao exercício físico do galope. Curiosamente, no entanto, as diferenças nos níveis de CORT foram preservadas, ou até mesmo acentuadas, nas médias ajustadas para o LAC. Por outro lado, os experimentos com choque nas patas mostraram que não há elevação da CORT 2 min após a aplicação de choques que produziram um aumento muito maior do ACTH (466%). Portanto, a causa mais provável do aumento residual de CORT nas médias ajustadas para o LAC é a estimulação direta do córtex adrenal pela ativação do sistema simpatoadrenal (Ehrhart-Bornstein et al., 1995). Esta hipótese não descarta a ação direta de outros secretagogos do córtex adrenal que possam ser liberados pela estimulação da MCPD.

A influência do esforço muscular na resposta neuroendócrina foi testada estimulando-se os ratos na APq, 4 semanas após a cirurgia, com a intensidade limiar de galope registrada 2 semanas antes na AGd. Nestas condições, o galope e o trote são substituídos por respostas motoras atenuadas de imobilidade, rotação e saltos. A premissa deste experimento considera que a resposta emocional à estimulação elétrica não é alterada, ou é até mesmo potenciada, durante a estimulação na APq, dissociando os componentes motores e emocionais da reação de defesa à estimulação da MCPD. De fato, nossos dados mostraram que as repostas de TRT e GLP/ROT foram seletivamente abolidos, assim como àqueles observados por Schenberg et al (2005). Nesta situação, os grupos da APq apresentaram níveis de CORT significativamente maiores que os controles intactos, mas não diferiram dos

controles operados, confirmando os efeitos duradouros da neurocirurgia no eixo HHA. Notavelmente, não houve nenhuma diferença estatística nos níveis de ACTH dos grupos com estimulação real ou fictícia da MCPD em relação aos controles operados e virgens. Estes resultados foram observados a despeito do aumento significativo dos níveis de LAC dos ratos estimulados na APq em relação aos controles operados e, marginalmente, aos ratos estimulados ficticiamente, mostrando que a APq não produz a supressão completa do esforço muscular e da emoção. Por outro lado, os resultados similares da ANCOVA indicam que o esforço muscular não teve influência alguma nas respostas neuroendócrinas dos ratos estimulados na APq.

Para analisar a resposta máxima de CORT à estimulação da MCPD, os experimentos da APq foram repetidos mantendo-se os ratos confinados por 30 min após a estimulação. Nesta situação também não houve diferença alguma entre os ratos com estimulação real ou fictícia da MCPD, tanto em relação à CORT quanto ao ACTH. Contudo, estes hormônios foram significativamente aumentados em relação aos controles virgens e operados. Estes efeitos podem ter sido devidos ao confinamento prolongado ou à elevação dos níveis de CO₂ em vista das condições de baixa ventilação da APq. Contudo, os níveis de LAC foram reduzidos nos grupos da APq em relação aos controles virgens, tornando improvável os efeitos da hipercapnia ou hipóxia. Portanto, a elevação destes hormônios deve ter sido causada pelo confinamento.

No conjunto, estes resultados corroboram os estudos preliminares do nosso laboratório (Silva, 2003; Schenberg et al., 2008) e fornecem provas adicionais da consistência do modelo de AP por estimulação da MCPD (Schimitel et al., 2011; Gentil, 1988; Jenck et al., 1995; Deakin and Graeff, 1991

Schenberg *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004). O presente estudo também sugere que os resultados recentes de Lim e colaboradores (2011), relatando aumentos expressivos da CORT (200%) 30 min após a estimulação elétrica da MCPD, foram devidos ao esforço muscular associado ao comportamento de fuga particularmente intenso dos ratos em arenas de grandes dimensões (1 m²). Conforme mencionado, os nossos resultados estão de acordo com ampla literatura mostrando que os AP não são seguidos do aumento da secreção do ACTH, CORT ou PRL (Liebowitz *et al.*, 1985; Cameron *et al.*, 1987; Woods *et al.*, 1987; Levin *et al.*, 1987; Woods *et al.*, 1988 Hollander *et al.*, 1989a,b; Kellner *et al.*, 1998). Tal como foi sugerido por Petrowski e colaboradores (2010), nossos dados também sugerem que a ausência de respostas neuroendócrinas dos AP não é devida à adaptação do eixo aos ataques recorrentes de pânico.

O presente estudo é notável por numerosas razões. Primeiro, eles trazem a teste a hipótese de Selye (1936,1976) da não-especificidade da resposta do estresse. Embora criticada desde o seu início, o conceito da inespecificidade foi somente testado recentemente por Pacak e colaboradores (1998). Esses autores mostraram que diferentes estressores originam padrões específicos de respostas neuroendócrinas. Além disso, os hormônios (ACTH e adrenalina) e transmissores (noradrenalina) não respondem na mesma proporção para a mesma alteração na intensidade do estresse. Segundo, a falta de respostas neuroendócrinas durante os comportamentos defensivos evocados da estimulação elétrica da MCPA foi demonstrada em ratos com níveis baixos de CORT, diferentemente do observado por Schenberg e colaboradores (2003). Terceiro, na medida que o presente estudo baseia-se em comportamentos defensivos incondicionados, este resultado ajuda a

esclarecer a literatura conflitante em pacientes de pânico, nos quais os resultados podem ter sido influenciados pela ansiedade antecipatória e comorbidade com transtornos afetivos (Lopez et al., 1990; Garcia-Leal et al., 2005). Por fim, como a ausência de ativação do eixo HHA durante estresse emocional parece ser uma característica única da reação de defesa evocada da estimulação elétrica da MCPD e dos AP, nossos dados sugerem que estas respostas são provocadas pela ativação do mesmo mecanismo central (Deakin and Graeff, 1991; Jenck et al., 1995; Schenberg et al., 2001). Enquanto os AP espontâneos são muitas vezes diagnosticados como ataques cardíacos ou doenças obstrutivas graves, a estimulação da MCPA, é sem dúvida, aversiva tanto em seres humanos quanto em animais. Há poucas dúvidas, portanto, sobre a experiência subjetiva de ambas as condições como um verdadeiro estresse emocional. Consequentemente, as respostas do eixo HHA e da PRL são provavelmente inibidas durante os AP. Embora a inibição do eixo HHA seja um fenômeno raro, Levine e colaboradores (Conner et al., 1971; Erskine e Levine, 1973) demonstraram que os aumentos dos níveis de ACTH induzidos por choque foram atenuados pelo comportamento agressivo (choque induzindo a luta) provocado pela apresentação da mesma programação de choques na presença de outro rato. Mais importante, Bhatnagar e colaboradores (2000) mostraram que o eixo HHA de ratos cronicamente estressados é inibido por projeções colecistocininérgicas da MCPA para o núcleo paraventricular posterior do tálamo. Além disso, é digno de nota que existem projeções da coluna ventrolateral da MCPA para a subdivisão endócrina do núcleo paraventricular do hipotálamo (Floyd et al., 1996). Embora a fisiologia das últimas projeções não tenha sido estudada até o momento, as projeções da MCPA para o núcleo paraventricular posterior do tálamo podem estar

envolvidas na inibição do eixo HHA durante AP. Por outro lado, é importante lembrar que o hormônio atrial natriurético é aumentado nos AP induzidos por lactato de sódio, o que pode contribuir para a inibição do eixo HHA deste modelo (Kellner et al., 1998). ACTH já está expressivamente aumentado (466%) 2 min após o término do choque nas patas, principalmente, considerando-se a duração curta do estímulo

CONCLUSÕES

- 1 O procedimento de habituação para redução da resposta neuroendócrina ao estresse é ineficaz.
- 2 A liberação de ACTH é expressivamente aumentada 2 min após o término do estresse emocional e físico causado pelo choque nas patas durante 1 minuto.
- 3 A estimulação da MCPA no limiar da resposta de imobilidade em AG não eleva os níveis hormonais de CORT, ACTH e PRL .
- 4 A elevação moderada dos níveis plasmáticos de ACTH produzida pela estimulação da MCPA no limiar da resposta de galope é produzida devido ao exercício físico empenhado no comportamento.
- 5 A estimulação elétrica da MCPA na APq aboliu seletivamente as respostas de galope e trote.
- 6 A estimulação elétrica da MCPA no limiar da resposta de galope na APq não ativa o eixo HHA nem após 2 ou 30 minutos.
- 7 Estes estudos sugerem que a ausência de respostas neuroendócrinas dos AP não é devida à adaptação do eixo aos ataques recorrentes de pânico.
- 8 Nossos dados fornecem provas adicionais da consistência do modelo de AP por estimulação da MCPD.

REFERÊNCIAS

- Adamec RE, Burton P, Shallow T, Budgell J (1999) Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress- induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle-effective hemisphere depends on the behavior. *Physiol Behav* 65:739–751.
- Alves ACA (2007) Funções Comportamentais das divisões compacta e difusa do núcleo dorsomedial do hipotálamo de ratos. Dissertação de Mestrado em ciências fisiológicas. UFES, Vitória.
- Angst J and Wicki W (1993). The epidemiology of frequent and less frequent panic attacks. In :SA Montgomery (Ed.), *Psychopharmacology of Panic*. New York: Oxford University Press, p. 7-24.
- Angst J.and W. Wicki. The Zurich Study. XI. Is dysthymia a separate form of depression? Results of the Zurich Cohort Study. *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.* 240 (6):349-354, 1991.
- Antoni FA (1993) Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol* 14:76-122.
- Antunes-Rodrigues, Elias, Valença, & McCann, 2004;
- APA (1980). *DSM III: Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders of American Psychiatric Association, Third Edition*, American Psychiatric Pres Washington, DC.
- APA (1980). *DSM-III: Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders of American Psychiatric Press* Washington, DC.
- Aschenbrand S. G, P. C. Kendall, A. Webb, S. M. Safford, and E. Flannery-Schroeder. Is childhood separation anxiety disorder a predictor of adult panic disorder and agoraphobia? A seven-year longitudinal study. *J.Am.Acad.Child Adolesc.Psychiatry.* 42 (12):1478-1485, 2003.

- Atkinson H. C, S. A. Wood, E. S. Castrique, Y. M. Kershaw, C. C. Wiles, and S. L. Lightman. Corticosteroids mediate fast feedback of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis via the mineralocorticoid receptor. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* 294 (6):E1011-E1022, 2008.
- Axelrod J, Reisine TD (1984) Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224:452–459. (Sapolsky et al., 31 1984)
- Baertschi AJ, Ward DG, Gann DS (1976) Role of atrial receptors in the control of ACTH. *Am J Physiol* 231:692-699.
- Ballenger J. C. Comorbidity of panic and depression: implications for clinical management. *Int.Clin.Psychopharmacol.* 13 Suppl 4:S13-7.:S13-S17, 1998.
- Battaglia M, S. Bertella, E. Politi, L. Bernardeschi, G. Perna, A. Gabriele, and L. Bellodi. Age at onset of panic disorder: influence of familial liability to the disease and of childhood separation anxiety disorder. *Am.J.Psychiatry.* 152 (9):1362-1364, 1995.
- Benedetti M, Merino R, Kusuda R, Ravanelli MI, Cadetti F, dos SP, Zanon S, Lucas G (2012) Plasma corticosterone levels in mouse models of pain. *Eur J Pain* 16:803-815.
- Berczi I (1994) The role of the growth and lactogenic hormone family in immune function. *Neuroimmunomodulation* 1:201.
- Bhatnagar S, Meaney MJ (1995) Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J Neuroendocrinol* 7:97-108.
- Bhatnagar S, Viau V, Chu A, Soriano L, Meijer OC, Dallman MF (2000) A cholecystokinin-mediated pathway to the paraventricular thalamus is

recruited in chronically stressed rats and regulates hypothalamic-pituitary-adrenal function. *J Neurosci* 20:5564-5573.

Bhatnagar S., R. Huber, N. Nowak, and P. Trotter. Lesions of the posterior paraventricular thalamus block habituation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to repeated restraint. *J. Neuroendocrinol.* 14 (5):403-410, 2002.

Biondi M, Picardi A (1999) Psychological stress and neuroendocrine function in humans: the last two decades of research. *Psychother Psychosom* 68:114-150.

Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC (2004) Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125:71-89.

Blanchard D. C., N. S. Canteras, C. M. Markham, N. S. Pentkowski, and R. J. Blanchard. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 29 (8):1243-1253, 2005.

Blanchard R, Griebel G, Guardiola-Lemaitre B, Brush MM, Lee J, Blanchard C (1997) An ethopharmacological analysis of selective activation of 5-HT_{1A} receptors: the mouse 5-HT_{1A} syndrome. *Pharmacol Biochem Behav* 57:897-908.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19:225-268.

Bowlby J (1983). *Attachment and Loss*. 2ⁿ Edition, New York: Basic Books.

- Brack K. E, S. M. Jeffery, and T. A. Lovick. Cardiovascular and respiratory responses to a panicogenic agent in anaesthetised female Wistar rats at different stages of the oestrous cycle. *Eur.J.Neurosci.* 23 (12):3309-3318, 2006.
- Brack K. E. and T. A. Lovick. Neuronal excitability in the periaqueductal grey matter during the estrous cycle in female Wistar rats. *Neuroscience.* 144 (1):325-335, 2007.
- Cameron OG, Lee MA, Curtis GC, McCann DS (1987) Endocrine and physiological changes during "spontaneous" panic attacks. *Psychoneuroendocrinology* 12:321-331.
- Campmany L., O. Pol, and A. Armario. The effects of two chronic intermittent stressors on brain monoamines. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 53 (3):517-523, 1996.
- Caron RW, Deis RP (1996) Participation of opioid and serotonergic systems in prolactin secretion induced by hypothalamic action of estradiol. *Neuroendocrinology* 64:124-130.
- Caron RW, Salicioni AM, Deis RP (1997) Regulation of prolactin secretion by adrenal steroids in oestrogen-treated ovariectomized rats: participation of endogenous opioid peptides. *Neuropharmacology* 36:1433-1438.
- Carr D. B., D. V. Sheehan, O. S. Surman, J. H. Coleman, D. J. Greenblatt, G. R. Heninger, K. J. Jones, P. H. Levine, and W. D. Watkins. Neuroendocrine correlates of lactate-induced anxiety and their response to chronic alprazolam therapy. *Am.J.Psychiatry* 143 (4):483-494, 1986.
- Cassano G. B., A. Petracca, and G. Perugi. Clomipramine for panic disorder I. The first 10 weeks of a long-term comparison with imipramine. *J.Affective Dis.* 14:123-127, 1997.

- Charney DS and Manji HK (2004). Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE. Res5*.
- Chen DY, Deutsch JA, Gonzalez MF, Gu Y (1993) The induction and suppression of c-fos expression in the rat brain by cholecystikinin and its antagonist L364,718. *Neurosci Lett* 149:91-94.
- Cirulli F., D. Santucci, G. Laviola, E. Alleva, and S. Levine. Behavioral and hormonal responses to stress in the newborn mouse: effects of maternal deprivation and chlordiazepoxide. *Dev.Psychobiol.* 27 (5):301-316, 1994.
- Clement H. W, M. Kirsch, C. Hasse, C. Opper, D. Gemsa, and W. Wesemann. Effect of repeated immobilization on serotonin metabolism in different rat brain areas and on serum corticosterone. *J.Neural Transm.* 105 (10-12):1155-1170, 1998.
- Cohen M. E. and P. D. White. Life situations, emotions and circulatory asthenia. *Psychosom.Med.* 13:335-357, 1951.
- Collett D (2003) Modelling Binary Data. London: Chapman & Hall/CRC.
- Conner RL, Vernikos-Danellis J, Levine S (1971) Stress, fighting and neuroendocrine function. *Nature* 234:564-566.
- Corbacho AM, Valacchi G, Kubala L, Olano-Martin E, Schock BC, Kenny TP, Cross CE (2004) Tissue-specific gene expression of prolactin receptor in the acute-phase response induced by lipopolysaccharides. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E750-E757.
- Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N (1987) Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res* 43:113-73.:113-173.

- D'Amato F. R., C. Zanettini, V. Lampis, R. Coccurello, T. Pascucci, R. Ventura, S. Puglisi-Allegra, C. A. Spatola, P. Pesenti-Gritti, D. Oddi, A. Moles, and M. Battaglia. Unstable maternal environment, separation anxiety, and heightened CO₂ sensitivity induced by gene-by-environment interplay. *PLoS.ONE*. 6 (4):e18637, 2011.
- D'Amato FR, Cabib S, Puglisi-Allegra S, Patacchioli FR, Cigliana G, Maccari S, Angelucci L (1992) Effects of acute and repeated exposure to stress on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in mice during postnatal development. *Horm Behav* 26:474-485.
- Daskalakis N. P, S. E. Claessens, J. J. Laboyrie, L. Enthoven, M. S. Oitzl, D. L. Champagne, and E. R. de Kloet. The newborn rat's stress system readily habituates to repeated and prolonged maternal separation, while continuing to respond to stressors in context dependent fashion. *Horm.Behav.* 60 (2):165-176, 2011.
- de Boer SF, Koopmans SJ, Slangen JL, van der GJ (1990) Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol Behav* 47:1117-1124.
- de Boer SF, van der GJ, Slangen JL (1989) Plasma catecholamine and corticosterone responses to predictable and unpredictable noise stress in rats. *Physiol Behav* 45:789-795.
- de Kloet E. R.. Steroids, stability and stress. *Front Neuroendocrinol.* 16 (4):416-425, 1995.
- de Kloet E. R.. Steroids, stability and stress. *Front Neuroendocrinol.* 16 (4):416-425, 1995.
- de Kloet ER, Rosenfeld P, van Eekelen JA, Sutanto W, Levine S (1988) Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res* 73:101-20.:101-120.

- de Kloet ER, Sybesma H, Reul HM (1986) Selective control by corticosterone of serotonin₁ receptor capacity in raphe-hippocampal system. *Neuroendocrinology* 42:513-521.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19:269-301.
- Deakin JFW, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 5:305-315.
- Depot M, Caille G, Mukherjee J, Katzman MA, Cadieux A, Bradwejn J (1999) Acute and chronic role of 5-HT₃ neuronal system on behavioral and neuroendocrine changes induced by intravenous cholecystokinin tetrapeptide administration in humans. *Neuropsychopharmacology* 20:177-187.
- Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL (1997) Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology* 65:360-368.
- Dijkstra H, F. J. Tilders, M. A. Hiehle, and P. G. Smelik. Hormonal reactions to fighting in rat colonies: prolactin rises during defence, not during offence. *Physiol Behav.* 51 (5):961-968, 1992.
- Dobráková M, Kvetnansky R, Oprsalová Z, Jezová D (1993) Specificity of the effect of repeated handling on sympathetic-adrenomedullary and pituitary-adrenocortical activity in rats. *Psychoneuroendocrinology* 18:163-174.
- Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP (2009) Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiol Behav* 97:484-494.

- Dorow R, R. Horowski, G. Paschelke, and M. Amin. Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet*. 2 (8341):98-99, 1983.
- Dumont F. S, V. Biancardi, and R. Kinkead. Hypercapnic ventilatory response of anesthetized female rats subjected to neonatal maternal separation: insight into the origins of panic attacks? *Respir.Physiol Neurobiol*. 175 (2):288-295, 2011.
- Durham RA, Eaton MJ, Moore KE, Lookingland KJ (1997) Effects of selective activation of dopamine D2 and D3 receptors on prolactin secretion and the activity of tuberoinfundibular dopamine neurons. *Eur J Pharmacol* 335:37-42.
- Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Gonzalez-Hernandez J, Holst JJ, Waterman MR, Scherbaum WA (1995) Sympathoadrenal regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Res* 21:13-24.
- Emanuel RL, Thull DL, Girard DM, Majzoub JA (1989) Developmental expression of corticotropin releasing hormone messenger RNA and peptide in rat hypothalamus. *Peptides* 10:1165-1169.
- Erhardt A, Ising M, Unschuld PG, Kern N, Lucae S, Putz B, Uhr M, Binder EB, Holsboer F, Keck ME (2006) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in patients with panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 31:2515-2522.
- Erskine MS, Levine S (1973) Suppression of pituitary-adrenal activity and shock-induced fighting in rats. *Physiol Behav* 11:787-790.
- Euker JS, Meites J, Riegler GD (1975) Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. *Endocrinology* 96:85-92.

- Fernandes G. A, P. Perks, N. K. Cox, S. L. Lightman, C. D. Ingram, and N. Shanks. Habituation and cross-sensitization of stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity: effect of lesions in the paraventricular nucleus of the thalamus or bed nuclei of the stria terminalis. *J.Neuroendocrinol.* 14 (7):593-602, 2002.
- File S. E, R. G. Lister, and D. J. Nutt. Intrinsic actions of benzodiazepine antagonists. *Neurosci.Lett.* 32 (2):165-168, 1982.
- Floyd NS, Keay KA, Arias CM, Sawchenko PE, Bandler R (1996) Projections from the ventrolateral periaqueductal gray to endocrine regulatory subdivisions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the rat. *Neurosci Lett* 220:105-108.
- Frances A., G. M. Miele, T. A. Widiger, H. A. Pincus, D. Manning, and W. W. Davis. The classification of panic disorders: from Freud to DSM-IV. *J.Psychiatr.Res.* 27 Suppl 1:3-10.:3-10, 1993.
- Freedman R. R., P. Ianni, E. Ettegui, and N. Puthenzath. Ambulatory monitoring of panic disorder. *Arch.Gen.Psychiatry.* 42 (3):244-248, 1985.
- Freeman E. W, C. A. Frye, K. Rickels, P. A. Martin, and S. S. Smith. Allopregnanolone levels and symptom improvement in severe premenstrual syndrome. *J.Clin.Psychopharmacol.* 22 (5):516-520, 2002.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80:1523-1631.
- Freud S. (1896). On right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as "anxiety neurosis". In: RM Hutchins (Editor-in-Chief), *Great Books of the Western World*, vol 54, *Selected Paper on Hysteria*. Chicago: The Encyclopaedia Britannica, Inc., 1978, p.25-118.

- Fujikawa T, Soya H, Tamashiro KL, Sakai RR, McEwen BS, Nakai N, Ogata M, Suzuki I, Nakashima K (2004) Prolactin prevents acute stress-induced hypocalcemia and ulcerogenesis by acting in the brain of rat. *Endocrinology* 145:2006-2013.
- Fujiwara A, Yoshida T, Otsuka T, Hayano F, Asami T, Narita H, Nakamura M, Inoue T, Hirayasu Y (2011) Midbrain volume increase in patients with panic disorder. *Psychiatry Clin Neurosci* 65:365-373.
- Gala RR (1990) The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci* 46:1407-1420.
- Gallo M. A. and S. S. Smith. Progesterone withdrawal decreases latency to and increases duration of electrified prod burial: a possible rat model of PMS anxiety. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 46 (4):897-904, 1993.
- Garcia-Leal C, Del-Ben CM, Leal FM, Graeff FG, Guimaraes FS (2010) Escitalopram prolonged fear induced by simulated public speaking and released hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *J Psychopharmacol* 24:683-694.
- Garcia-Leal C, Parente AC, Del-Ben CM, Guimaraes FS, Moreira AC, Elias LL, Graeff FG (2005) Anxiety and salivary cortisol in symptomatic and nonsymptomatic panic patients and healthy volunteers performing simulated public speaking. *Psychiatry Res* 133:239-252.
- Genest S. E., N. Balon, S. Laforest, G. Drolet, and R. Kinkead. Neonatal maternal separation and enhancement of the hypoxic ventilatory response in rat: the role of GABAergic modulation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J.Physiol.* 583 (Pt 1):299-314, 2007.
- Genest S. E., R. Gulemetova, S. Laforest, G. Drolet, and R. Kinkead. Neonatal maternal separation induces sex-specific augmentation of the hypercapnic

ventilatory response in awake rat. *J.Appl.Physiol.* 102 (4):1416-1421, 2007.

Gentil V (1986) [Physiopathology of the panic syndrome]. *AMB Rev Assoc Med Bras* 32:101-107.

Gentil V (1988) The aversive system, 5-HT and panic attacks. In: *Animal Models of Psychiatric Disorders* (Simon P, Soubrié P, Wildlocher D, eds), pp 142-145. Basel: Karger.

Gesing A, Bilang-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM (2001) Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 21:4822-4829.

Girard I, Garland T, Jr. (2002) Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice. *J Appl Physiol* 92:1553-1561.

Gittelman-Klein R and D. F. Klein. School phobia: controlled imipramine treatment. *Calif.Med.* 115 (3):42, 1971.

Goetz RR, Klein DF, Gorman JM (1994) Consistencies between recalled panic and lactate-induced panic. *Anxiety* 1:31-36.

Goodwin G. A and G. A. Barr. Developmental changes in the behavioral and autonomic effects of kappa opioid receptor stimulation of the midbrain periaqueductal gray. *Dev.Psychobiol.* 46 (1):47-56, 2005.

Gorman J. M, S. Mathew, and J. Coplan. Neurobiology of early life stress: nonhuman primate models. *Semin.Clin.Neuropsychiatry.* 7 (2):96-103, 2002.

- Gorman J. M., S. T. Browne, L. A. Papp, J. Martinez, L. Welkowitz, J. D. Coplan, R. R. Goetz, J. Kent, and D. F. Klein. Effect of antipanic treatment on response to carbon dioxide. *Biol.Psychiatry* 42 (11):982-991, 1997.
- Gorman J. M.. Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress.Anxiety*. 4 (4):160-168, 1996.
- Graeff F. G, A. Parente, C. M. Del-Ben, and F. S. Guimaraes. Pharmacology of human experimental anxiety. *Braz.J.Med.Biol.Res* 36 (4):421-432, 2003.
- Graeff F. G. and H. Zangrossi, Jr. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Cent.Nerv.Syst.Agents Med.Chem.* 10 (3):207-217, 2010.
- Graeff F. G.. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 28 (3):239-259, 2004.
- Graeff FG, Garcia-Leal C, Del-Ben CM, Guimaraes FS (2005) Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *An Acad Bras Cienc* 77:477-491.
- Graeff FG, Guimaraes FS, de Andrade TG, Deakin JFW (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 54:129-141.
- Gray JA (1991) *The Psychology of Fear and Stress*. Cambridge: Cambridge University Press, 2Ed.
- Gray M, B. Bingham, and V. Viau. A comparison of two repeated restraint stress paradigms on hypothalamic-pituitary-adrenal axis habituation, gonadal status and central neuropeptide expression in adult male rats. *J.Neuroendocrinol.* 22 (2):92-101, 2010.
- Griebel G, Sanger DJ, Perrault G (1996) Further evidence for differences between non-selective and BZ-1 (omega 1) selective, benzodiazepine

receptor ligands in murine models of "state" and "trait" anxiety. *Neuropharmacology* 35:1081-1091.

Griffiths J and T. Lovick. Withdrawal from progesterone increases expression of alpha4, beta1, and delta GABA(A) receptor subunits in neurons in the periaqueductal gray matter in female Wistar rats. *J.Comp Neurol.* 486 (1):89-97, 2005.

Griffiths J. L and T. A. Lovick. GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABAA receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience.* 136 (2):457-466, 2005.

Gulinello M, Q. H. Gong, and S. S. Smith. Progesterone withdrawal increases the alpha4 subunit of the GABA(A) receptor in male rats in association with anxiety and altered pharmacology - a comparison with female rats. *Neuropharmacology* 43 (4):701-714, 2002.

Gulinello M., Q. H. Gong, X. Li, and S. S. Smith. Short-term exposure to a neuroactive steroid increases alpha4 GABA(A) receptor subunit levels in association with increased anxiety in the female rat. *Brain Res.* 910 (1-2):55-66, 2001.

Hauger R. L., M. A. Millan, M. Lorang, J. P. Harwood, and G. Aguilera. Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology.* 123 (1):396-405, 1988.

Helmstetter FJ (1992) Contribution of the amygdala to learning and performance of conditional fear. *Physiol Behav* 51: 678 1271–1276

Hennessy MB, Levine S (1977) Effects of various habituation procedures on pituitary-adrenal responsiveness in the mouse. *Physiol Behav* 18:799-802.

- Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H, Fujino M (1998) A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 393:272-276.
- Hofer M. A, J. R. Masmela, S. A. Brunelli, and H. N. Shair. Behavioral mechanisms for active maternal potentiation of isolation calling in rat pups. *Behav.Neurosci.* 113 (1):51-61, 1999.
- Hofer M. A. Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology.* 21 (2):203-217, 1996.
- Hofer M. A., S. A. Brunelli, and H. N. Shair. Potentiation of isolation-induced vocalization by brief exposure of rat pups to maternal cues. *Dev.Psychobiol.* 27 (8):503-517, 1994.
- Hollander E, Fairbanks J, DeCaria C, Liebowitz MR (1989) Pharmacological dissection of panic and depersonalization. *Am J Psychiatry* 146:402.
- Hollander E, Liebowitz MR, Cohen B, Gorman JM, Fyer AJ, Papp LA, Klein DF (1989) Prolactin and sodium lactate-induced panic. *Psychiatry Res* 28:181-191.
- Hollander E, Liebowitz MR, DeCaria C, Klein DF (1989) Fenfluramine, cortisol, and anxiety. *Psychiatry Res* 31:211-213.
- Hollander E, Liebowitz MR, Gorman JM, Cohen B, Fyer A, Klein DF (1989) Cortisol and sodium lactate-induced panic. *Arch Gen Psychiatry* 46:135-140.
- Holsboer F.. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology.* 23 (5):477-501, 2000.
- Jaferi A and S. Bhatnagar. Corticotropin-releasing hormone receptors in the medial prefrontal cortex regulate hypothalamic-pituitary-adrenal activity

and anxiety-related behavior regardless of prior stress experience. *Brain Res.* 1186:212-223, 2007.

Jaferi A. and S. Bhatnagar. Corticosterone can act at the posterior paraventricular thalamus to inhibit hypothalamic-pituitary-adrenal activity in animals that habituate to repeated stress. *Endocrinology.* 147 (10):4917-4930, 2006.

Jenck F, Moreau JL, Martin JR (1995) Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res* 57:181-191.

Jezova D, Vigas M, Hlavacova N, Kukumberg P (2010) Attenuated neuroendocrine response to hypoglycemic stress in patients with panic disorder. *Neuroendocrinology* 92:112-119.

Johnson P. L., W. A. Truitt, S. D. Fitz, C. A. Lowry, and A. Shekhar. Neural pathways underlying lactate-induced panic. *Neuropsychopharmacology.* 33 (9):2093-2107, 2008.

Johnson P. L., W. Truitt, S. D. Fitz, P. E. Minick, A. Dietrich, S. Sanghani, L. Traskman-Bendz, A. W. Goddard, L. Brundin, and A. Shekhar. A key role for orexin in panic anxiety. *Nat.Med.* 16 (1):111-115, 2010.

Kamilaris TC, Johnson EO, Calogero AE, Kalogeras KT, Bernardini R, Chrousos GP, Gold PW (1992) Cholecystokinin-octapeptide stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal function in rats: role of corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 130:1764-1774.

Kant G. J, J. R. Leu, S. M. Anderson, and E. H. Mougey. Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav.* 40 (6):775-779, 1987.

- Kant G. J., T. Eggleston, L. Landman-Roberts, C. C. Kenion, G. C. Driver, and J. L. Meyerhoff. Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 22 (4):631-634, 1985.
- Kaufman J.and D. Charney. Comorbidity of mood and anxiety disorders. *Depress.Anxiety.* 12 Suppl 1:69-76.:69-76, 2000.
- Keller G (1997). Síndrome do Pânico. Ed: O Globo.
- Kellner M, Herzog L, Yassouridis A, Holsboer F, Wiedemann K (1995) Possible role of atrial natriuretic hormone in pituitary-adrenocortical unresponsiveness in lactate-induced panic. *Am J Psychiatry* 152:1365-1367.
- Kellner M, Knaudt K, Jahn H, Holsboer F, Wiedemann K (1998) Atrial natriuretic hormone in lactate-induced panic attacks: mode of release and endocrine and pathophysiological consequences. *J Psychiatr Res* 32:37-48.
- Kent J. M, L. A. Papp, J. M. Martinez, S. T. Browne, J. D. Coplan, D. F. Klein, and J. M. Gorman. Specificity of panic response to CO(2) inhalation in panic disorder: a comparison with major depression and premenstrual dysphoric disorder. *Am.J.Psychiatry.* 158 (1):58-67, 2001.
- Kim JJ, Diamond DM (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3:453–462.
- Kinkead R, S. E. Genest, R. Gulemetova, Y. Lajeunesse, S. Laforest, G. Drolet, and A. Bairam. Neonatal maternal separation and early life programming of the hypoxic ventilatory response in rats. *Respir.Physiol Neurobiol.* 149 (1-3):313-324, 2005.
- Kirschbaum C, Prussner JC, Stone AA, Federenko I, Gaab J, Lintz D, Schommer N, Hellhammer DH (1995) Persistent high cortisol responses to

repeated psychological stress in a subpopulation of healthy men.
Psychosom Med 57:468-474.

Kjaer M, Secher NH, Bangsbo J, Perko G, Horn A, Mohr T, Galbo H (1996)
 Hormonal and metabolic responses to electrically induced cycling during
 epidural anesthesia in humans. *J Appl Physiol* 80:2156-2162.

Klein D. F. and M. Fink. Psychiatric reaction patterns to imipramine.
Am.J.Psychiat. 119:432-438, 1962.

Klein D. F. Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes.
Psychopharmacologia 5:397-408, 1964.

Klein D. F.. False suffocation alarms, spontaneous panics, and related
 conditions. An integrative hypothesis. *Arch.Gen.Psychiatry.* 50 (4):306-
 317, 1993.

Klein DF (1993) Panic may be a misfiring suffocation alarm. In:
 Psychopharmacology of Panic (Montgomery SA, ed), pp 67-73. New York:
 Oxford University Press.

Klein R. G. Is panic disorder associated with childhood separation anxiety
 disorder? *Clin.Neuropharmac.* 18 (suppl.2):S7-S14, 1995.

Klein S, Nicolas LB, Lopez-Lopez C, Jacobson LH, McArthur SG,
 Grundschober C, Prinssen EP (2010) Examining face and construct
 validity of a noninvasive model of panic disorder in Lister-hooded rats.
Psychopharmacology (Berl) 211:197-208.

Kobelt P, Paulitsch S, Goebel M, Stengel A, Schmidtman M, van dV, I, Tebbe
 JJ, Veh RW, Klapp BF, Wiedenmann B, Tache Y, Monnikes H (2006)
 Peripheral injection of CCK-8S induces Fos expression in the dorsomedial
 hypothalamic nucleus in rats. *Brain Res* 1117:109-117.

- Kollack-Walker S, C. Don, S. J. Watson, and H. Akil. Differential expression of c-fos mRNA within neurocircuits of male hamsters exposed to acute or chronic defeat. *J.Neuroendocrinol.* 11 (7):547-559, 1999.
- Kooijman R, Hooghe-Peters EL, Hooghe R (1996) Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the immune system. *Adv Immunol* 63:377-454.:377-454.
- Krulich L, E. Hefco, P. ILLner, and C. B. Read. The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. *Neuroendocrinology* 16:293-311, 1974.
- Kuhn C. M. and S. M. Schanberg. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int.J.Dev.Neurosci.* 16 (3-4):261-270, 1998.
- Lachuer J, I. Delton, M. Buda, and M. Tappaz. The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress is stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain Res.* 638 (1-2):196-202, 1994.
- Lamberts SWJ, Macleod RM (1990) Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* 20:279-318.
- Lapierre Y. D, V. J. Knott, and R. Gray. Psychophysiological correlates of sodium lactate. *Psychopharmacol.Bull.* 20 (1):50-57, 1984.
- Le Melledo J. M, Driel M. Van, N. J. Coupland, P. Lott, and G. S. Jhangri. Response to flumazenil in women with premenstrual dysphoric disorder. *Am.J.Psychiatry.* 157 (5):821-823, 2000.
- Ledoux JE (2012) Evolution of human emotion: a view through fear. *Prog Brain Res* 195:431-42.:431-442.

- Levin AP, Doran AR, Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman JM, Klein DF, Paul SM (1987) Pituitary adrenocortical unresponsiveness in lactate-induced panic. *Psychiatry Res* 21:23-32.
- Levine S (2001) Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiol Behav* 73:255-260.
- Levine S (2002) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotox Res* 4:557-564.
- Levine S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 746:275-88; discussion 289-93:275-288, 1994.
- Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman JM, Dillon D, Davies S, Stein JM, Cohen BS, Klein DF (1985) Specificity of lactate infusions in social phobia versus panic disorders. *Am J Psychiatry* 142:947-950.
- Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer AJ, Levitt M, Dillon D, Levy G, Appleby IL, Anderson S, Palij M, Davies SO (1985) Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Arch Gen Psychiatry* 42:709-719.
- Lim AT, Sheward WJ, Copolov D, Windmill D, Fink G (1990) Atrial Natriuretic Factor is Released into Hypophyseal Portal Blood: Direct Evidence that Atrial Natriuretic Factor may be a Neurohormone Involved in Hypothalamic Pituitary Control. *J Neuroendocrinol* 2:15-18.
- Lim LW, Blokland A, van DM, Visser-Vandewalle V, Tan S, Vlamings R, Janssen M, Jahanshahi A, ziz-Mohammadi M, Steinbusch HW, Schruers K, Temel Y (2011) Increased plasma corticosterone levels after periaqueductal gray stimulation-induced escape reaction or panic attacks in rats. *Behav Brain Res* 218:301-307.

- Lippmann M., Bress A, C. B. Nemeroff, P. M. Plotsky, and L. M. Monteggia. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur.J.Neurosci.* 25 (10):3091-3098, 2007.
- Longordo F, Fan J, Steimer T, Kopp C, Luthi A (2011) Do mice habituate to "gentle handling?" A comparison of resting behavior, corticosterone levels and synaptic function in handled and undisturbed C57BL/6J mice. *Sleep* 34:679-681.
- Lopez AL, Kathol RG, Noyes R, Jr. (1990) Reduction in urinary free cortisol during benzodiazepine treatment of panic disorder. *Psychoneuroendocrinology* 15:23-28.
- Lovick T. A, J. L. Griffiths, S. M. Dunn, and I. L. Martin. Changes in GABA(A) receptor subunit expression in the midbrain during the oestrous cycle in Wistar rats. *Neuroscience*. 131 (2):397-405, 2005.
- Lovick T. A, J. L. Griffiths, S. M. Dunn, and I. L. Martin. Changes in GABA(A) receptor subunit expression in the midbrain during the oestrous cycle in Wistar rats. *Neuroscience*. 131 (2):397-405, 2005.
- Lovick T. A. and A. J. Devall. Progesterone withdrawal-evoked plasticity of neural function in the female periaqueductal grey matter. *Neural Plast.* 2009:730902. Epub; %2008 Dec 2.:730902, 2009.
- Lovick T. A.. Pro-nociceptive action of cholecystokinin in the periaqueductal grey: a role in neuropathic and anxiety-induced hyperalgesic states. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 32 (4):852-862, 2008.
- Lucas LR, Wang CJ, McCall TJ, McEwen BS (2007) Effects of immobilization stress on neurochemical markers in the motivational system of the male rat. *Brain Res* 1155:108-115.

- Ma XM, Lightman SL (1998) The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *J Physiol* 510:605-614.
- Marti O and A. Armario. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int.J.Dev.Neurosci.* 16 (3-4):241-260, 1998.
- Marti O, Armario A (1997) Influence of regularity of exposure to chronic stress on the pattern of habituation of pituitary-adrenal hormones, prolactin and glucose. *Stress* 1:179-189.
- Masini C. V, S. Sauer, J. White, H. E. Day, and S. Campeau. Non-associative defensive responses of rats to ferret odor. *Physiol Behav.* 87 (1):72-81, 2006.
- Masini CV, Day HE, Campeau S (2008) Long-term habituation to repeated loud noise is impaired by relatively short interstressor intervals in rats. *Behav Neurosci* 122:210-223.
- Mason JW (1971) A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. *J Psychiatr Res* 8:323-333.
- Matsumoto H, Maruyama M, Noguchi J, Horikoshi Y, Fujiwara K, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Inoue K, Fujino M (2000) Stimulation of corticotropin-releasing hormone-mediated adrenocorticotropin secretion by central administration of prolactin-releasing peptide in rats. *Neurosci Lett* 285:234-238.
- Matsumoto H, Noguchi J, Horikoshi Y, Kawamata Y, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M (1999) Stimulation of prolactin release by prolactin-releasing peptide in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 259:321-324.

- McEwen B. S.. Steroid hormones are multifunctional messengers to the brain. *Trends Endocrinol.Metab.* 2 (2):62-67, 1991.
- McEwen BS (1982) Glucocorticoids and hippocampus: receptors in search of a function. New York: Verlag-Springer.
- McEwen BS (2002) Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging* 23:921-939.
- McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873-904.
- McEwen BS, Wingfield JC (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 43:2-15.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM (1996) Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 18:49-72.
- Meijer OC, de Kloet ER (1998) Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity. *Crit Rev Neurobiol* 12:1-20.
- Melia K. R, A. E. Ryabinin, R. Schroeder, F. E. Bloom, and M. C. Wilson. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *J.Neurosci.* 14 (10):5929-5938, 1994.
- Mera T, Fujihara H, Kawasaki M, Hashimoto H, Saito T, Shibata M, Saito J, Oka T, Tsuji S, Onaka T, Ueta Y (2006) Prolactin-releasing peptide is a potent mediator of stress responses in the brain through the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience* 141:1069-1086.

- Meyerhoff JL, Oleshansky MA, Mougey EH (1988) Psychologic stress increases plasma levels of prolactin, cortisol, and POMC-derived peptides in man. *Psychosom Med* 50:295-303.
- Mioduszeewski R. and V. Critchlow. Forebrain structures which mediate the effects of stress on prolactin and growth hormone secretion in the rat. *verificar* 110:1972-1976, 1982.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD (2007) When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317:1079-1083.
- Molosh A. I., P. L. Johnson, S. D. Fitz, J. A. DiMicco, J. P. Herman, and A. Shekhar. Changes in central sodium and not osmolarity or lactate induce panic-like responses in a model of panic disorder. *Neuropsychopharmacology*. 35 (6):1333-1347, 2010.
- Nashold Jr. BS, Wilson WP, Slaughter DG (1969) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30:14-24.
- Natelson BH, Ottenweller JE, Cook JA, Pitman D, McCarty R, Tapp WN (1988) Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol Behav* 43:41-46.
- Neill J. D.. Effects of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87:1192-1197, 1970.
- Neumann I. D., S. A. Kromer, and O. J. Bosch. Effects of psycho-social stress during pregnancy on neuroendocrine and behavioural parameters in lactation depend on the genetically determined stress vulnerability. *Psychoneuroendocrinology*. 30 (8):791-806, 2005.
- Okimoto D. K, A. Blaus, M. V. Schmidt, M. K. Gordon, G. W. Dent, and S. Levine. Differential expression of c-fos and tyrosine hydroxylase mRNA in

the adrenal gland of the infant rat: evidence for an adrenal hyporesponsive period. *Endocrinology*. 143 (5):1717-1725, 2002.

Oreland S., C. Pickering, C. Gokturk, L. Oreland, L. Arborelius, and I. Nylander.

Two repeated maternal separation procedures differentially affect brain 5-hydroxytryptamine transporter and receptors in young and adult male and female rats. *Brain Res*. 1305:S37-S49, 2009.

Otte C, Kellner M, Arlt J, Jahn H, Holsboer F, Wiedemann K (2002) Prolactin but not ACTH increases during sodium lactate-induced panic attacks. *Psychiatry Res* 109:201-205.

Otteweller J. E, B. H. Natelson, D. L. Pitman, and S. D. Drastal. Adrenocortical and behavioral responses to repeated stressors: toward an animal model of chronic stress and stress-related mental illness. *Biol.Psychiatry*. 26 (8):829-841, 1989.

Otteweller J. E, B. H. Natelson, D. L. Pitman, and S. D. Drastal. Adrenocortical and behavioral responses to repeated stressors: toward an animal model of chronic stress and stress-related mental illness. *Biol.Psychiatry*. 26 (8):829-841, 1989.

Pacak K, Baffi JS, Kvetnansky R, Goldstein DS, Palkovits M (1998) Stressor-specific activation of catecholaminergic systems: implications for stress-related hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses. *Adv Pharmacol* 42:561-4.:561-564.

Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS (1998) Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275:R1247-R1255.

- Pace T. W, M. A. Cole, G. Ward, B. A. Kalman, and R. L. Spencer. Acute exposure to a novel stressor further reduces the habituated corticosterone response to restraint in rats. *Stress*. 4 (4):319-331, 2001.
- Panksepp J., E. Nelson, and M. Bekkedal. Brain systems for the mediation of social separation-distress and social-reward. Evolutionary antecedents and neuropeptide intermediaries. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 807:78-100.:78-100, 1997.
- Paxinos G, Watson C (1998) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press.
- Peters A. and B. S. McEwen. Introduction for the allostatic load special issue. *Physiol Behav*. 106 (1):1-4, 2012.
- Petrowski K, Herold U, Joraschky P, Wittchen HU, Kirschbaum C (2010) A striking pattern of cortisol non-responsiveness to psychosocial stress in patients with panic disorder with concurrent normal cortisol awakening responses. *Psychoneuroendocrinology* 35:414-421.
- Petrowski K, Wintermann GB, Kirschbaum C, Bornstein SR (2012) Dissociation between ACTH and cortisol response in DEX-CRH test in patients with panic disorder. *Psychoneuroendocrinology*.
- Pilotte NS, Porter JC (1981) Dopamine in hypophysial portal plasma and prolactin in systemic plasma of rats treated with 5-hydroxytryptamine. *Endocrinology* 108:2137-2141.
- Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH (1988) Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol Behav* 43:47-55.
- Pitts F. N and J. N. McClure. Lactate metabolism in anxiety neurosis. *New Engl.J.Med.* 277:1329-1336, 1967.

- Preter M and D. F. Klein. Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*. 32 (3):603-612, 2008.
- Preter M, S. H. Lee, E. Petkova, M. Vannucci, S. Kim, and D. F. Klein. Controlled cross-over study in normal subjects of naloxone-preceding-lactate infusions; respiratory and subjective responses: relationship to endogenous opioid system, suffocation false alarm theory and childhood parental loss. *Psychol.Med*. 41 (2):385-393, 2011.
- Preter M.and D. F. Klein. Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*. 32 (3):603-612, 2008.
- Protopopescu X, Pan H, Tuescher O, Cloitre M, Goldstein M, Engelien A, Yang Y, Gorman J, LeDoux J, Stern E, Silbersweig D (2006) Increased brainstem volume in panic disorder: a voxel-based morphometric study. *Neuroreport* %20;17:361-363.
- Quintino dos Santos (2011) Determinantes biológicos da comorbidade dos Ataques de Pânico com Depressão e Ansiedade de Separação. Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas. UFES, Vitória.
- Razzoli M, L. Carboni, A. Guidi, P. Gerrard, and R. Arban. Social defeat-induced contextual conditioning differentially imprints behavioral and adrenal reactivity: a time-course study in the rat. *Physiol Behav*. 92 (4):734-740, 2007.
- Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT, Price JL, Hackman KA (1989) Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch Gen Psych* 46:493-500.

- Reul JM, Pearce PT, Funder JW, Krozowski ZS (1989) Type I and type II corticosteroid receptor gene expression in the rat: effect of adrenalectomy and dexamethasone administration. *Mol Endocrinol* 3:1674-1680.
- Rifkin A, D. F. Klein, D. Dillon, and M. Levitt. Blockade by imipramine or desipramine of panic induced by sodium lactate. *Am.J.Psychiatry*. 138 (5):676-677, 1981.
- Roberson-Nay R, Kendler KS (2011) Panic disorder and its subtypes: a comprehensive analysis of panic symptom heterogeneity using epidemiological and treatment seeking samples. *Psychol Med* 41:2411-2421.
- Roberson-Nay R, L. J. Eaves, J. M. Hettema, K. S. Kendler, and J. L. Silberg. Childhood separation anxiety disorder and adult onset panic attacks share a common genetic diathesis. *Depress.Anxiety*. 29 (4):320-327, 2012.
- Roberson-Nay R., D. F. Klein, R. G. Klein, S. Mannuzza, J. L. Moulton, III, M. Guardino, and D. S. Pine. Carbon dioxide hypersensitivity in separation-anxious offspring of parents with panic disorder. *Biol.Psychiatry*. 67 (12):1171-1177, 2010.
- Rodgers R. J, Y. Ishii, J. C. Halford, and J. E. Blundell. Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides*. 36 (5):303-325, 2002.
- Roncon C. M, C. Biesdorf, R. Santana, H. Zangrossi, Jr., F. G. Graeff, and E. A. Audi. The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey. *J.Psychopharmacol.*, 2012.
- Rosa CA (2012) Efeitos tardios do isolamento social neonatal e do desamparo aprendido sobre os níveis tissulares e taxa de renovação da serotonina da

regiões dorsal e ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal.

Dissertação de mestrado em Ciências Fisiológicas. Ufes, Vitória.

Rossier J, French E, Rivier C, Shibasaki T, Guillemin R, Bloom FE (1980)

Stress-induced release of prolactin: blockade by dexamethasone and naloxone may indicate beta-endorphin mediation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:666-669.

Sachar E. J, G. Asnis, R. S. Nathan, U. Halbreich, M. A. Tabrizi, and F. S.

Halpern. Dextroamphetamine and cortisol in depression. Morning plasma cortisol levels suppressed. *Arch.Gen.Psychiatry*. 37 (7):755-757, 1980.

Sajdyk T. J, D. A. Schober, D. R. Gehlert, and A. Shekhar. Role of corticotropin-

releasing factor and urocortin within the basolateral amygdala of rats in anxiety and panic responses. *Behav.Brain Res*. 100 (1-2):207-215, 1999.

Sajdyk T. J. and A. Shekhar. Sodium lactate elicits anxiety in rats after repeated

GABA receptor blockade in the basolateral amygdala. *Eur.J.Pharmacol*. 394 (2-3):265-273, 2000.

Salomons AR, van Luijk JA, Reinders NR, Kirchhoff S, Arndt SS, Ohl F (2010)

Identifying emotional adaptation: behavioural habituation to novelty and immediate early gene expression in two inbred mouse strains. *Genes Brain Behav* 9:1-10.

Schapiro S, Geller E, Eiduson S (1962) Neonatal adrenal cortical response to

stress and vasopressin. *Proc Soc Exp Biol Med* 109:937-41.:937-941.

Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré ECM, Vargas LC (2001) Modeling panic

attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25:647-659.

Schenberg LC, Capucho LB, Vatanabe RO, Vargas LC (2002) Acute effects of

clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked

unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159:138-144.

Schenberg LC, Dos Reis AM, Ferreira Pova RM, Tufik S, Silva SR (2008) A panic attack-like unusual stress reaction. *Horm Behav* 54:584-591.

Schenberg LC, Póvoa RMF, Costa AL, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS (2005) Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1279-1298.

Schenberg LC, Vasquez EC, da Costa MB (1993) Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats. *Brain Res* 621:50-58.

Schimitel F. G, G. M. de Almeida, D. N. Pitol, R. S. Armini, S. Tufik, and L. C. Schenberg. Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience*. 200 (1):59-73, 2012.

Schommer NC, Hellhammer DH, Kirschbaum C (2003) Dissociation between reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic-adrenal-medullary system to repeated psychosocial stress. *Psychosom Med* 65:450-460.

Schreiber W, Lauer CJ, Krumrey K, Holsboer F, Krieg JC (1996) Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 15:7-15.

Schwinn G, von zur MA, Warnecke U (1976) Effects of dexamethasone on thyrotrophin and prolactin plasma levels in rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 82:486-491.

Scribner KA, Walker CD, Cascio CS, Dallman MF (1991) Chronic streptozotocin diabetes in rats facilitates the acute stress response without altering pituitary or adrenal responsiveness to secretagogues. *Endocrinology* 129:99-108.

- Selye H (1956) Stress and Disease. New York: McGraw-Hill.
- Selye H (1976) Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J* 115:53-56.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*:v.138, p.32.
- Shair H. N., S. A. Brunelli, J. R. Masmela, E. Boone, and M. A. Hofer. Social, thermal, and temporal influences on isolation-induced and maternally potentiated ultrasonic vocalizations of rat pups. *Dev.Psychobiol.* 42 (2):206-222, 2003.
- Shekhar A and J. A. DiMicco. Defense reaction elicited by injection of GABA antagonists and synthesis inhibitors into the posterior hypothalamus in rats. *Neuropharmacology.* 26 (5):407-417, 1987.
- Shekhar A, J. S. Katner, W. P. Rusche, T. J. Sajdyk, and J. R. Simon. Fear-potentiated startle elevates catecholamine levels in the dorsomedial hypothalamus of rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 48 (2):525-529, 1994.
- Shekhar A, P. L. Johnson, T. J. Sajdyk, S. D. Fitz, S. R. Keim, P. E. Kelley, D. R. Gehlert, and J. A. DiMicco. Angiotensin-II is a putative neurotransmitter in lactate-induced panic-like responses in rats with disruption of GABAergic inhibition in the dorsomedial hypothalamus. *J.Neurosci.* 26 (36):9205-9215, 2006.
- Shekhar A, T. S. Sajdyk, S. R. Keim, K. K. Yoder, and S. K. Sanders. Role of the basolateral amygdala in panic disorder. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 877:747-50.:747-750, 1999.
- Shekhar A. GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. *Brain Res.* 627 (1):9-16, 1993.

- Shekhar A., J. N. Hingtgen, and J. A. DiMicco. GABA receptors in the posterior hypothalamus regulate experimental anxiety in rats. *Brain Res.* 512 (1):81-88, 1990.
- Shekhar A., S. R. Keim, J. R. Simon, and W. J. McBride. Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 55 (2):249-256, 1996.
- Shekhar A. and S. R. Keim. The circumventricular organs form a potential neural pathway for lactate sensitivity: implications for panic disorder. *J.Neurosci.* 17 (24):9726-9735, 1997.
- Shlik J, Aluoja A, Vasar V, Vasar E, Podar T, Bradwejn J (1997) Effects of citalopram treatment on behavioural, cardiovascular and neuroendocrine response to cholecystokinin tetrapeptide challenge in patients with panic disorder. *J Psychiatry Neurosci* 22:332-340.
- Siegel A., T. A. Roeling, T. R. Gregg, and M. R. Kruk. Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 23 (3):359-389, 1999.
- Siegel R. A, N. Conforti, and I. Chowers. Neural pathways mediating the prolactin secretory response to acute neurogenic stress in the male rat. *Brain Res.* 198:43-53, 1980.
- Siegmund A, Koster L, Meves AM, Plag J, Stoy M, Strohle A (2011) Stress hormones during flooding therapy and their relationship to therapy outcome in patients with panic disorder and agoraphobia. *J Psychiatr Res* 45:339-346.
- Silva S (2003) Neuroendocrinologia da reação de defesa induzida por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal de ratos Wistar e

selvagens: uma resposta incomum de “estresse” similar ao ataques de pânico. Tese de doutorado em Ciências Fisiológicas. UFES, Vitória.

Sinha S. S, R. R. Goetz, and D. F. Klein. Physiological and behavioral effects of naloxone and lactate in normal volunteers with relevance to the pathophysiology of panic disorder. *Psychiatry Res.* 149 (1-3):309-314, 2007.

Siqueira C. C, R. R. Rossoni, A. N. Tiengo, S. Tufik, and L. C. Schenberg. Methimazole-induced hypothyroidism inhibits the panic-like behaviors produced by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Psychoneuroendocrinology.* 35 (5):706-716, 2010.

Siqueira C. C, R. R. Rossoni, and L. C. Schenberg. Dorsal periaqueductal gray matter-evoked panic-like behaviors are markedly inhibited by a low peripheral dose of thyrotropin releasing hormone. *Psychoneuroendocrinology.* 35 (2):262-271, 2010.

Smith S. S and C. S. Woolley. Cellular and molecular effects of steroid hormones on CNS excitability. *Cleve.Clin.J.Med.* 71 Suppl 2:S4-10.:S4-10, 2004.

Smith S. S. Estrous hormones enhance coupled, rhythmic olivary discharge in correlation with facilitated limb stepping. *Neuroscience* 82 (1):83-95, 1998.

Smith S. S. Withdrawal properties of a neuroactive steroid: implications for GABA(A) receptor gene regulation in the brain and anxiety behavior. *Steroids* 67 (6):519-528, 2002.

Smolensky MH, Halberg F, Harter J, Hsi B, Nelson W (1978) Higher corticosterone values at a fixed single timepoint in serum from mice "trained" by prior handling. *Chronobiologia* 5:1-13.

Snedecor and Cochran, 1982

- Snedecor GW and Cochran WG (1980) Statistical Methods. Ed 7: The Iowa State University.
- Stein M. B., M. E. Tancer, and T. W. Uhde. Heart rate and plasma norepinephrine responsivity to orthostatic challenge in anxiety disorders. Comparison of patients with panic disorder and social phobia and normal control subjects. *Arch.Gen.Psychiatry*. 49 (4):311-317, 1992.
- Stohr T, Szuran T, Pliska V, Feldon J (1999) Behavioural and hormonal differences between two Lewis rat lines. *Behav Brain Res* 101:163-172.
- Storey J. D, Robertson D. A., Beattie J. E; Reid I. C; Mitchell S. N., and D. J. Balfour. Behavioural and neurochemical responses evoked by repeated exposure to an elevated open platform. *Behav.Brain Res*. 166 (2):220-229, 2006.
- Strohle A, Romeo E, di Michele F, Pasini A, Yassouridis A, Holsboer F, Rupprecht R (2003) Neuroactive steroid levels in patients with panic disorder. *Am J Psychiat* 160:593-594.
- Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S (1993) Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 57:204-212.
- Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S (1993) Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res* 75:185-192.
- Sudré E. C. M., Barros M. R, Sudré G. N., and Schenberg L. C.. Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short- and long-term adaptation mechanisms. *Behav.Brain Res*. 58:141-154, 1993.

- Taheri S., J. M. Zeitzer, and E. Mignot. The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. *Annu.Rev.Neurosci.* 25:283-313. Epub;2002 Mar;20.:283-313, 2002.
- Takahashi L. K. and N. H. Kalin. Early developmental and temporal characteristics of stress-induced secretion of pituitary-adrenal hormones in prenatally stressed rat pups. *Brain Res.* 558 75-78, 1991.
- Tanke M. A, D. S. Fokkema, B. Doornbos, F. Postema, and J. Korf. Sustained release of corticosterone in rats affects reactivity, but does not affect habituation to immobilization and acoustic stimuli. *Life Sci.* 83 (3-4):135-141, 2008.
- Targum SD, Marshall LE (1989) Fenfluramine provocation of anxiety in patients with panic disorder. *Psychiatry Res* 28:295-306.
- Thorsell A, K. Carlsson, R. Ekman, and M. Heilig. Behavioral and endocrine adaptation, and up-regulation of NPY expression in rat amygdala following repeated restraint stress. *Neuroreport.* 10 (14):3003-3007, 1999.
- Tokita R, Nakata T, Katsumata H, Konishi S, Onodera H, Imaki J, Minami S (1999) Prolactin secretion in response to prolactin-releasing peptide and the expression of the prolactin-releasing peptide gene in the medulla oblongata are estrogen dependent in rats. *Neurosci Lett* 276:103-106.
- Turnbull A. V. and C. L. Rivier. Sprague-Dawley rats obtained from different vendors exhibit distinct adrenocorticotropin responses to inflammatory stimuli. *Neuroendocrinology.* 70 (3):186-195, 1999.
- Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Otsuki K, Hobara T, Yamagata H, Watanabe Y (2010) Maternal and genetic factors in stress-resilient and -vulnerable rats: a cross-fostering study. *Brain Res* 1316:43-50.

- Uchida S, Nishida A, Hara K, Kamemoto T, Suetsugi M, Fujimoto M, Watanuki T, Wakabayashi Y, Otsuki K, McEwen BS, Watanabe Y (2008) Characterization of the vulnerability to repeated stress in Fischer 344 rats: possible involvement of microRNA-mediated down-regulation of the glucocorticoid receptor. *Eur J Neurosci* 27:2250-2261.
- Van de Kar L. D and M. L. Blair. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.* 20 (1):1-48, 1999.
- Van de kar LD and Blair ML. 1999. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 20: 1-48.
- Vargas LC, Schenberg LC (2001) Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 155:260-268.
- Walker C. D., R. M. Sapolsky, M. J. Meaney, W. W. Vale, and C. L. Rivier. Increased pituitary sensitivity to glucocorticoid feedback during the stress nonresponsive period in the neonatal rat. *Endocrinology.* 119 (4):1816-1821, 1986.
- Whitnall MH, Kiss A, Aguilera G (1993) Contrasting effects of central alpha-1-adrenoreceptor activation on stress-responsive and stress-nonresponsive subpopulations of corticotropin-releasing hormone neurosecretory cells in the rat. *Neuroendocrinology* 58:42-48.
- Wiedemann K, Jahn H, Kellner M (2000) Effects of natriuretic peptides upon hypothalamo-pituitary-adrenocortical system activity and anxiety behaviour. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108:5-13.
- Wiedemann K., L. Herzog, and M. Kellner. Atrial natriuretic hormone inhibits corticotropin-releasing hormone-induced prolactin release in man. *J.Psychiatr.Res.* 29 (1):51-58, 1995.

- Wilent W. B., M. Y. Oh, C. M. Buetefisch, J. E. Bailes, D. Cantella, C. Angle, and D. M. Whiting. Induction of panic attack by stimulation of the ventromedial hypothalamus. *J.Neurosurg.* 112 (6):1295-1298, 2010.
- Winslow J. T. and T. R. Insel. Endogenous opioids: do they modulate the rat pup's response to social isolation? *Behav.Neurosci.* 105 (2):253-263, 1991.
- Wohr M and R. K. Schwarting. Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. *Behav.Neurosci.* 122 (2):310-330, 2008.
- Woods S. W, D. S. Charney, P. L. Delgado, and G. R. Heninger. The effect of long-term imipramine treatment on carbon dioxide-induced anxiety in panic disorder patients. *J.Clin.Psychiatry.* 51 (12):505-507, 1990.
- Woods SW, Charney DS, Goodman WK, Heninger GR (1988) Carbon dioxide-induced anxiety. Behavioral, physiologic, and biochemical effects of carbon dioxide in patients with panic disorders and healthy subjects. *Arch Gen Psychiatry* 45:43-52.
- Woods SW, Charney DS, McPherson CA, Gradman AH, Heninger GR (1987) Situational panic attacks. Behavioral, physiologic, and biochemical characterization. *Arch Gen Psychiatry* 44:365-375.
- Wust S, Federenko IS, van Rossum EF, Koper JW, Hellhammer DH (2005) Habituation of cortisol responses to repeated psychosocial stress-further characterization and impact of genetic factors. *Psychoneuroendocrinology* 30:199-211.
- Yeragani V. K, R. Pohl, R. Balon, J. M. Rainey, R. Berchou, and A. Ortiz. Sodium lactate infusion after treatment with tricyclic antidepressants: behavioral and physiological findings. *Biol.Psychiat.* 24:767-774, 1988.

- Yonkers K. A., T. Pearlstein, and R. A. Rosenheck. Premenstrual disorders: bridging research and clinical reality. *Arch.Womens Ment.Health.* 6 (4):287-292, 2003.
- Young RF (1989) Brain and spinal stimulation: how and to whom! *Clin Neurosurg* 35:429-447.
- Yu-Lee LY (2002) Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res* 57:435-55.:435-455.
- Zaretskaia M. V, D. V. Zaretsky, A. Shekhar, and J. A. DiMicco. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. *Brain Res.* 928 (1-2):113-125, 2002.

ANEXO I

RATOS DESCARTADOS DEVIDO O USO DE HEPARINA							
		CORT	ACTH	PRL	GLI	LAC	TRI
		ng/ml	pg/ml	ng/ml	mmol/L	mmol/L	mg/dl
VIRGENS DO BIOTÉRIO SEM ESTRASSE	Média	62,3	71,7	17	0	0	150,6
	N						5
	EPM	8	8	8	8	8	8
		29,7	10,4	3,5	0	0	18,15
VIRGENS DO BIOTÉRIO DE PASSAGEM	Média	100,4	100	23,9	0	0	197
	N	7	7	7	7	7	7
	EPM	21,7	14,5	2,	0	0	12,2
HÍBRIDOS (WISTAR E SELVAGENS) DO BIOTÉRIO DE PASSAGEM	Média	210,4	170,9	22,7	14,2	3,46	94,7
	N	7	7	7	10	10	10
	EPM	11,3	88,3	6,3	0,8	0,67	11,6
CIRURGIA COM TREPANAÇÃO COM 5 DIAS DE PÓS CIRURGICO	Média	633,7	123,2	17,0	0	0	60,1
	N	17	17	10	7	7	7
	EPM	65,2	20,7	6,3	0	0	10,5
ESTIMULAÇÃO DA MCPD COM 5 DIAS DE PÓS CIRURGICO	Média	732,5	728,22	39,0	16,8	18,10	94,7
	N	10	10	6	6	6	10
	EPM	97,7	166,52	12	2,4	4,5	12,5
RESTRIÇÃO DE 15 MINUTOS	Média	0	339,2	0	0	0	121,2
	N						2
	EPM	9	8	9	9	9	9
		0	63,3	0	0	0	20,28
RESTRIÇÃO DE 5 MINUTOS	Média	539,2	249,7	71,2	0	0	109,0
	N						1
	EPM	9	9	9	9	9	9
		86	105	9,5	0	0	23,13
MANIPULAÇÃO E EXPOSIÇÃO AO APARATO ESPERIMENTAL POR 5 DIAS	Média	526,0	143,3	34,21	0	0	131,7
	N	11	11	11	11	11	11
	EPM	82,7	17,12	9,1	0	0	17,68

ANEXO III

RATOS DESCARTADOS DEVIDO AO KIT DE RADIOIMUNOENSAIO DE CORT COM DEFEITO E AO SOM DE RATOS NO SHUTTLE BOX

		CORT	ACTH	PRL	GLI	LAC	TRI
		ng/ml	pg/ml	ng/ml	mmol/L	mmol/L	mg/dl
RESTRIÇÃO 15 MIN	Média	1171,74	255,80	0	0	0	96,51
	N	19	19	19	19	19	19
	EPM	73,48	22,02	0	0	0	6,16
MANIP E EXPOSIÇÃO AO AMBIENTE POR 5 DIAS DURANTE 30 MINUTOS	Média	1566,09	69,39	0	0	0	139,44
	N	9	9	9	9	9	9
	EPM	131,74	9,69	0	0	0	12,02
POS CIRÚRGICO 10DIAS COM SUSPENSÃO PELO ABDOMÊM	Média	1363,89	166,54	0	0	0	117,31
	N	15	15	15	15	15	15
	EPM	162,79	32,19	0	0	0	20,01
POS CIRÚRGICO 10DIAS SEM SUSPENSÃO PELO ABDOMÊM	Média	1256	100,5	0	0	0	104,1
	N	21	21	21	21	21	21
	EPM	98,4	13,4	0	0	0	7,6
POS CIRÚRGICO 130DIAS COM TREPANAÇÃO	Média	557,25	65,52	0	0	0	112,48
	N	14	14	14	14	14	14
	EPM	64,87	11,88	0	0	0	9,41
POS CIRURGICO DE 30 DIAS FURO COM FURO	Média	281,39	61,50	0	0	0	127,83
	N	8	8	8	8	8	8
	EPM	22,91	6,19	0	0	0	17,91
POS CIRURGICO DE 15 DIAS FURO COM FURO	Média	658,35	73,44	0	0	0	102,11
	N	9	9	9	9	9	9
	EPM	88,82	5,60	0	0	0	10,55
CÂNULA COM 1 DIA E INJETADO SALINA	Média	1361,31	78,69	0	0	0	84,26
	N	19	19	19	19	19	19
	EPM	64,57	7,58	0	0	0	5,98
CÂNULA COM 1 DIA E INJETADO CIANETO	Média	1379,42	88,20	0	0	0	84,07
	N	14	14	14	14	14	14
	EPM	152,54	17,96	0	0	0	9,27
21 DIAS DE TRATAMENTO INTRAPERITONEAL COM SALINA CANULADO E INJETADO CIANETO	Média	1461,2	141,6	0	0	0	93,4
	N	3	13	13	13	13	13
	EPM	117,3	56,6	0	0	0	14

